

# **Konformationelle Änderungen der archaeellen RNA Polymerase während des Transkriptionszyklus**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Sarah Schulz  
aus Cloppenburg

1. Referent:	Prof. Dr. Philip Tinnefeld
2. Referent:	PD Dr. Christof Maul
eingereicht am:	14.12.2015
mündliche Prüfung (Disputation) am:	29.06.2016

Druckjahr 2017

## Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### Publikationen

- Gietl, A., Holzmeister, P., Blombach, F., Schulz, S., Voith von Voithenberg, L., Lamb, D.C., Werner, F., Tinnefeld, P., Grohmann, D.: *Eukaryotic and archaeal TBP and TFB/TF(II)B follow different promoter DNA bending pathways*. Nucleic Acids Research, 2014. **42**(10): p. 6219-31.
- Gust, A., Zander, A., Gietl, A., Holzmeister, P., Schulz, S., Lalkens, B., Tinnefeld, P., Grohmann, D.: *A starting point for fluorescence-based single-molecule measurements in biomolecular research*. Molecules, 2014. **19**(10): p. 15824-65.
- Nagy, J., Grohmann, D., Cheung, A.C.M., Schulz, S., Smollett, K., Werner, F., Michaelis, J.: *Complete architecture of the archaeal RNA polymerase open complex from single-molecule FRET and NPS*. Nature Communications, 2015. **6**: p. 6161.
- Schulz, S., Kramm, K., Werner, F., Grohmann, D.: *Fluorescently labeled recombinant RNAP system to probe archaeal transcription initiation*. Methods, 2015. **86**: p. 10-18
- Schulz, S., Gietl, A., Smollett, K., Tinnefeld, P., Werner, F., Grohmann, D.: *TFE and Spt4/5 open and close the RNA polymerase clamp during the transcription cycle*. PNAS, 2016. **113**: p. 1816-25
- Sheppard, C., Blombach, F., Belsom, A., Schulz, S., Daviter, T., Smollett, K., Mahieu, E., Erdmann, S., Tinnefeld, P., Garrett, R., Grohmann, D., Rappsilber, J., Werner, F.: *Repression of RNA polymerase by the archaeo-viral regulator ORF145/RIP*. Nature Communications, 2016. **7**: 13595

**Tagungsbeiträge**

„Describing the dynamic behavior of the transcriptional machinery using single-molecule FRET” (Poster), 18<sup>th</sup> International Workshop on Single Molecule Spectroscopy and Ultrasensitive Analysis in the Life Sciences”, 05.09.-07.09.2012, Berlin

“Conformation of the RNA Polymerase clamp throughout the transcription cycle” (Poster), 25<sup>th</sup> UK RNA Polymerase Workshop, 18.03.-19.03.2013, Chicheley

“Conformation of the RNAP clamp throughout the transcription cycle” (Vortrag), 26<sup>th</sup> UK RNA Polymerase Workshop, 02.04.-03.04.2014, Newcastle

“Conformation of the RNAP clamp throughout the transcription cycle” (Poster), Molecular Biology of Archaea 4, 19.05.-22.05.2014, Paris

“Describing the RNA polymerase clamp movement throughout the transcription cycle using sm-FRET” (Poster), International Physics of Living Systems Network (iPoLS), Annual Meeting 2014, 21.07.-24.07.2014, München

# Inhaltsverzeichnis

<b>Vorveröffentlichungen der Dissertation .....</b>	<b>3</b>
<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>5</b>
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>8</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>9</b>
<b>1     <b>Einleitung</b>.....</b>	<b>10</b>
<b>2     <b>Theoretische Grundlagen</b> .....</b>	<b>15</b>
2.1   Biologische Grundlagen .....	15
2.1.1   Funktion und Zusammensetzung der RNA Polymerase .....	15
2.1.2   Die RNA Polymerase Clamp .....	17
2.1.3   Transkriptionsfaktoren .....	19
2.1.4   Transkriptionszyklus.....	21
2.2   Genetische Integration von unnatürlichen Aminosäuren.....	24
2.3   Markierungsstrategien für Proteine.....	25
2.4   Photophysikalische Grundlagen .....	27
2.4.1   Absorption und Emission von Fluorophoren .....	27
2.4.2   Fluoreszenzanisotropie .....	30
2.4.3   Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) .....	32
2.4.4   Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie .....	36
<b>3     <b>Material und Methoden</b> .....</b>	<b>38</b>
3.1   Mikrobiologische Methoden.....	38
3.1.1   Transformation .....	38
3.1.2   Rekombinante Proteinexpression.....	38
3.2   Proteinbiochemische Methoden .....	40
3.2.1   Aufschluss und Reinigung von löslichen Proteinen.....	40
3.2.2   Aufschluss und Reinigung unlöslicher RNA Polymerase Untereinheiten .....	41
3.2.3   Aufschluss und Reinigung mittels Affinitätschromatographie .....	42
3.2.4   Konzentrationsbestimmung .....	44
3.2.5   SDS-PAGE.....	45
3.2.6   Gelverzögerungsexperimente (Electrophoretic Mobility Shift Assay) .....	46
3.2.7   Markierung von Proteinen .....	47
3.2.8   Assemblierung der RNA Polymerase .....	47
3.3   Synthetische Oligonukleotide .....	49

3.4	Präparation der Transkriptionskomplexe .....	51
3.5	Bestimmung des Försterradius .....	51
3.6	Anisotropie-Messungen .....	52
3.7	Präparation der Flusskammer und Immobilisierung der Proben.....	53
3.8	Einzelmoleküldetektion mit Prisma-TIRF .....	54
3.9	Sauerstoffentzug und ROXS .....	56
3.10	Datenauswertung .....	56
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>61</b>
4.1	Expression und Reinigung der Transkriptionsfaktoren.....	61
4.2	Expression und Reinigung der RNAP Untereinheiten .....	61
4.3	Ortsspezifischer Einbau von Biotin in Rpo11 und Assemblierung Rpo3/11-Biotin .....	63
4.4	Ortsspezifischer Einbau von Fluorophoren in die RNAP Untereinheiten Rpo1 <sup>E257Azf</sup> und Rpo2 <sup>Q373Azf</sup> .....	64
4.5	Assemblierung der RNAP .....	65
4.6	Messung der Anisotropie und zugängliches Volumen der Fluorophore.....	68
4.7	Gelverzögerungsexperiment.....	69
4.8	Konformation der RNAP Clamp in einer freien RNAP .....	70
4.9	Konformation der RNAP Clamp im Prä-Initiationskomplex.....	73
4.10	Konformation der RNAP Clamp im Elongationskomplex.....	77
4.11	Kontrollexperimente.....	83
4.11.1	Einfluss der Immobilisierungsstrategie auf die mittleren FRET-Effizienzen .....	83
4.11.2	Einfluss der Wahl der Positionen der Farbstoffe .....	84
4.11.3	Einfluss der RNA-Sequenz im Elongationskomplex.....	85
4.12	Zusammenfassung der Histogramme .....	86
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>88</b>
5.1	Absolute Abstände .....	88
5.2	Die Konformation der Clamp in einer freien RNAP ist vorwiegend geschlossen .....	90
5.3	TFE öffnet die RNAP Clamp im Prä-Initiationskomplex .....	92
5.4	RNAP Clamp Konformationen im Elongationskomplex.....	95
5.5	Zusammenfassende Darstellung der RNAP Clamp Konformationen .....	98
<b>6</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>100</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>101</b>
<b>Anhang A: Herstellung von Polyethylenglycol-passivierten Quarzoberflächen.</b>		<b>103</b>
<b>Anhang B: Chromatogramme und SDS-Gele .....</b>		<b>105</b>
B.1	TBP.....	105

B.2 TFB.....	106
B.3 TFE.....	107
B.4 Spt4/5 .....	108
B.5 Rpo5.....	109
B.6 Rpo6.....	110
B.7 Rpo4/7 .....	111
B.8 Rpo10.....	112
B.9 Rpo12.....	113
B.10 Rpo3/11 .....	114
B.11 Rpo3.....	115
B.12 Rpo11 .....	116
B.13 Rpo1'E257Azf.....	118
B.14 Rpo2''Q373Azf.....	119
<b>Anhang C: Elongationskomplex mit RNAP<math>\Delta</math>Rpo4/7 .....</b>	<b>120</b>
<b>Anhang D: Zusammenfassung der FRET-Messungen.....</b>	<b>122</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>124</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>131</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>141</b>

## Zusammenfassung

Der erste Schritt der Genexpression ist die Transkription, bei der DNA in RNA umgeschrieben wird und die durch das Enzym RNA Polymerase (RNAP) ausgeführt wird. Die Transkription ist ein sehr dynamischer Prozess und wird durch das Zusammenspiel von RNA Polymerase und den Transkriptionsfaktoren reguliert. RNA Polymerasen bestehen aus mehreren Untereinheiten, die sich in funktionelle Einheiten gliedern, aber auch multiple flexible Elemente aufweisen, die im Laufe des Transkriptionszyklus Konformationsänderungen durchlaufen. Besonders eine dieser Domänen - die RNA Polymerase Clamp - ist strukturell sehr flexibel. Röntgenkristallstrukturen sowie Strukturen, die aus Kryo-Elektronenmikroskopie-Untersuchungen hervorgegangen sind, zeigen die Clamp in unterschiedlichen Konformationszuständen. Zudem ist die RNAP Clamp Ziel regulatorischer Transkriptionsfaktoren, wie z.B. TFE und Spt4/5, die an die Clamp assoziieren. Dies hebt die besondere Bedeutung der RNAP Clamp für die Funktion der RNAP hervor. Jedoch blieben die molekularen Mechanismen der Transkriptionsfaktoren bisher schwer nachvollziehbar. In dieser Arbeit wurde mit Hilfe von Einzelmolekül-Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET)-Messungen die Position der RNAP Clamp aus dem archaeellen Organismus *Methanocaldococcus jannaschii* in Abhängigkeit von unterschiedlichen Nukleinsäuren, Transkriptionsfaktoren, Zusammensetzung der RNA Polymerase und der Stufe im Transkriptionszyklus untersucht. Zunächst wurde die RNAP Clamp in einer freien Konfiguration mit unterschiedlicher Untereinheitenkomposition gemessen und anschließend der Einfluss des Transkriptionsfaktors TFE und des Elongationsfaktors Spt4/5 auf die Position der Clamp untersucht. Es wurde gezeigt, dass die RNAP Clamp beim Übergang vom geschlossenen zum offenen Prä-Initiationskomplex, das in DNA-Schmelzen resultiert, sich öffnet und das Öffnen durch TFE stimuliert wird. In Elongationskomplexen wird die RNAP Clamp durch den nicht-kodogenen Strang sowie durch Spt4/5 reguliert. TFE und Spt4/5 verschieben das Gleichgewicht in Richtung einer Hauptkonformation und beeinflussen die Struktur der RNAP möglicherweise durch einen allosterischen Schalter, womit eine mechanistische Erklärung für die Funktion der Faktoren geliefert wird. Insgesamt nimmt die RNAP Clamp vier unterschiedliche Konformationen ein, die von den Untereinheiten Rpo4/7, vom nicht-kodogenen Strang und den Transkriptionsfaktoren TFE und Spt4/5 abhängig sind.



## Abstract

Transcription is the first step in gene expression in which the DNA is transcribed into RNA and which is carried out by the enzyme RNA Polymerase (RNAP). Transcription is an intrinsically dynamic process which is regulated by the interplay of the RNAP and its transcription factors. RNAPs consist of multiple subunits that contain flexible domains. Further these domains undergo conformational changes throughout the transcription cycle. One of the RNAP domains - RNAP clamp - is a structurally mobile element. Both X-ray structures and cryo-electron microscopy reveal the clamp in multiple conformational states. Furthermore the RNAP clamp is a target for regulatory transcription factors e.g. for TFE and Spt4/5, which both associate to the clamp. This emphasizes that the clamp is an important functional regulator. But the molecular mechanisms of the transcription factors have remained elusive. In this work, single-molecule fluorescence resonance energy transfer (FRET) was used to monitor archaeal 12-subunit RNAP clamp conformations in the presence of different nucleic acids, transcription factors, compositions of the RNAP and to study these conformations at each step in transcription initiation and elongation. The RNAP clamp conformation was investigated in a free RNAP with different subunit-compositions and the influence of the transcription factor TFE and the elongation factor Spt4/5 on the clamp conformation was measured. The transition from the closed to the open pre-initiation complex, resulting in DNA-melting, leads to a clamp opening, which is stimulated by TFE. The RNAP clamp is modulated by the non-template strand and by Spt4/5 in elongation complexes. TFE or Spt4/5 shift the equilibria towards one of the main conformations suggesting that both prompt an allosteric switch that influences the structure of the RNAP and thereby provide a mechanistic rationale for the function of these factors. Taken altogether, the RNAP clamp adopts four different conformational states which are dependent on the subunits Rpo4/7, the non-template strand and the transcription factors TFE and Spt4/5.

# 1 Einleitung

Das zentrale Dogma der Molekularbiologie besagt, dass die Information in einer Zelle von der DNA (englisch: *desoxyribonucleic acid*) über die RNA (englisch: *ribonucleic acid*) zum Protein übertragen wird. Das heißt, dass die genetische Information, die in der DNA kodiert ist und die Aminosäuresequenz zellulärer Proteine definiert, zunächst über die molekulare Zwischenstufe RNA dekodiert wird. Der Prozess der RNA Synthese, bei der die genomische DNA als Matrize verwendet wird, wird Transkription genannt. Dies ist der erste Schritt in der Genexpression und ist in allen drei Domänen des Lebens - Bakterien, Eukaryoten und Archaea - konserviert [1]. Das dazu verantwortliche Enzym - die RNA Polymerase (RNAP) - wurde im Jahr 1959 von Weiss und Gladstone in Eukaryoten [2] und wenige Monate später auch in Prokaryoten entdeckt [3]. Die Transkription kann grob in drei Phasen geteilt werden: Initiation, Elongation und Termination [4]. In der ersten Phase wird die RNAP spezifisch auf einen dem Gen vorangehenden Sequenzabschnitt - den Promoter - rekrutiert und trennt die doppelsträngige DNA (DNA-Schmelzen) um den Transkriptionsstartpunkt des Gens. Die RNAP benötigt Sigma-Faktoren in Bakterien bzw. Transkriptionsinitiationsfaktoren in Eukaryoten und Archaeen, um den Promoter und den Transkriptionsstartpunkt auf der DNA zu erkennen [5]. Ein *in vitro* Assay für die Promoter-spezifische Transkription mit gereinigten Faktoren für das eukaryotische System wurde in den 90-er Jahren entwickelt und davon ausgehend ein minimales Set an Transkriptionsfaktoren gefunden, die für die Initiation der Transkription notwendig sind [6]. In der Elongationsphase transkribiert die RNAP die RNA, indem diese sich auf der DNA entlang bewegt bis eine Terminationssequenz am Ende des Gens die Termination der Transkription hervorruft. In diesem Schritt dissoziieren das fertige RNA-Transkript, die RNAP und die DNA-Matrize [7].

Die Kristallstrukturen einer bakteriellen (*Thermus aquaticus*) [8] und eukaryotischen (*Saccharomyces cerevisiae*) [9] RNAP wurden um die Jahrhundert-Wende gelöst. Die erste archaeelle RNAP Kristallstruktur wurde aus dem Organismus *Sulfolobus solfataricus* gelöst [10] und alle drei Strukturen wiesen eine hohe Ähnlichkeit untereinander auf, sodass dies ein Hinweis darauf war, dass der Ablauf und die grundlegenden Mechanismen der Transkription sehr wahrscheinlich in allen Organismen konserviert sind. Die RNAP-Struktur ist wie eine Krepsschere aufgebaut, dessen Scheren das aktive Zentrum umschließen [4]. Kristallstrukturen der RNAP innerhalb der unterschiedlichen Phasen im Transkriptionszyklus oder in Verbindung mit ihren Transkriptionsfaktoren führten zur Identifizierung von flexiblen strukturellen Elementen. Speziell der Vergleich

zwischen der Kristallstruktur der RNAP aus *Saccharomyces cerevisiae* mit dessen Elektronenmikroskop-Struktur führte zur Entdeckung einer bestimmten mobilen Domäne innerhalb der RNAP [11], welche sich in der RNAP Untereinheit Rbp1 (Rpo1 bzw.  $\beta'$  in Archaeen und Bakterien) in Eukaryoten befindet [9, 12, 13]. Das Erstellen eines *Backbone*-Modells der RNAP führte zum Schluss, dass die flexible Domäne die DNA im aktiven Zentrum der RNAP arretiert und diese Domäne somit als Klammer (englisch: *clamp*) agiert [9]. Weitere Hinweise auf die Flexibilität der Clamp lieferten zwei Kristallstrukturen der RNAP aus *Saccharomyces cerevisiae*, welche die RNAP Clamp in zwei unterschiedlichen Positionen zeigen [14]. Je nachdem, ob die RNAP aus 10 oder 12 Untereinheiten besteht oder an ein DNA/RNA-Hybrid gebunden ist, zeigt die Clamp eine offene oder geschlossene Konformation [14-17]. Der Übergang zwischen offener und geschlossener Konformation der Clamp könnte wichtig für die Transkription sein. So könnte die offene Konformation der Clamp das Laden der Promoter-DNA in das aktive Zentrum der RNAP für den Initiationsschritt der Transkription erlauben, während für den Übergang zum Elongationsschritt ein Schließen der Clamp notwendig sein könnte [18].

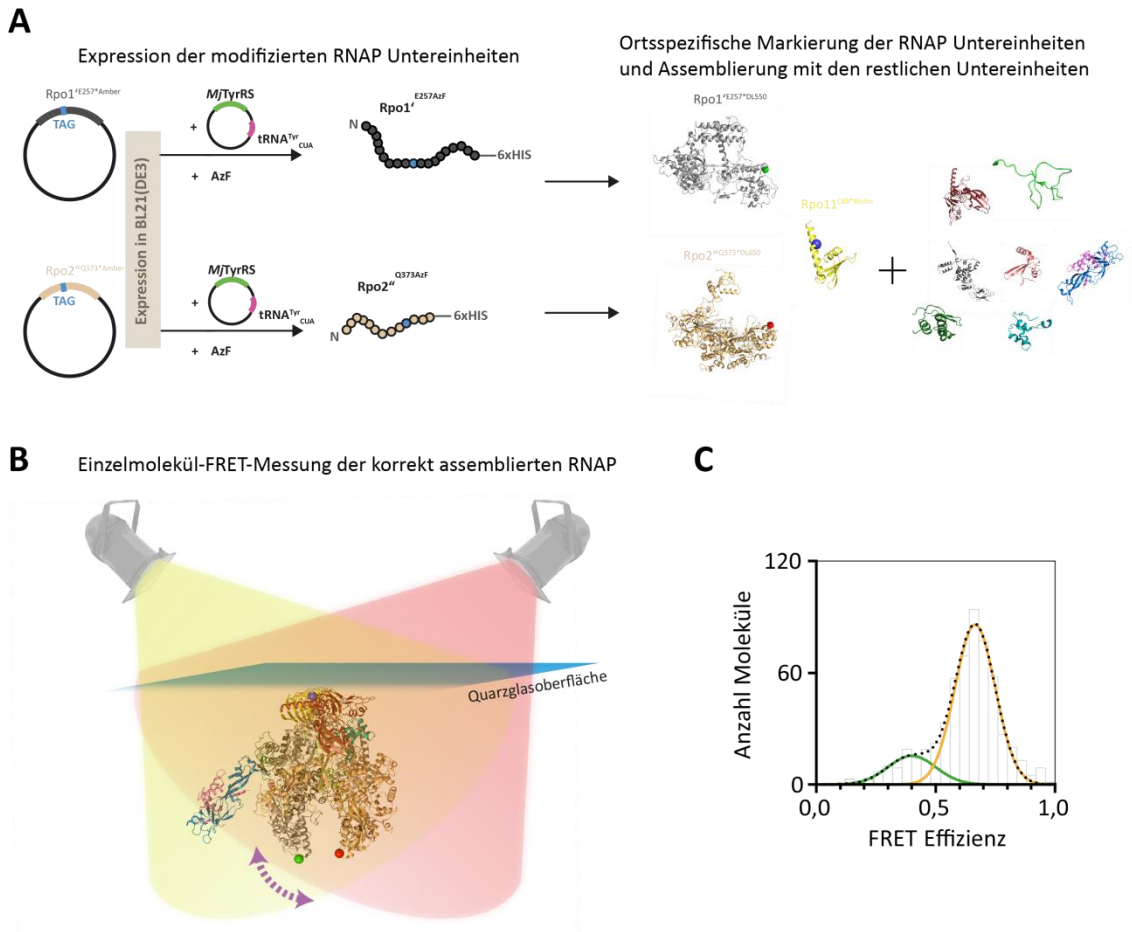
Die Clamp ist an ihrer Basis durch mehrere flexible Proteinregionen an die Untereinheiten Rpb1, 2 und 6 gebunden, die als Scharnier fungieren und so eine Bewegung der Clamp erlauben [14]. Durch die Bewegung der RNAP Clamp könnten die einzelnen Phasen des Transkriptionszyklus und z.B. die Prozessivität der Transkription sowie die Fähigkeit der RNAP solange mit der DNA assoziiert zu sein, bis ein Terminationssignal auftritt [19], reguliert werden. Die RNAP Clamp spielt des Weiteren auch in der Bildung und der Erhaltung der Transkriptionsblase eine Rolle [19]. Im aktiven Zentrum der RNAP befinden sich zwei mobile Elemente – *bridge* und *trigger helix* – die die korrekte Platzierung des richtigen Nukleotids im aktiven Zentrum sicherstellen und für das Einfügen des Nukleotids in die RNA und die damit einhergehende Translokation verantwortlich sind [20]. Beide Elemente sind an die Clamp gebunden, sodass kleine Bewegungen dieser auch eine Änderung der Bewegung der Clamp bewirken können. Umgekehrt könnten so natürlich auch Änderungen der Clamp die katalytische Fähigkeit der RNAP verändern und so die Elongationsrate und Prozessivität beeinflussen [21]. Weiterhin ist die RNAP Clamp in der Bindung regulierender Transkriptionsfaktoren während der Initiation und Elongation involviert [22]. Während die bakterielle RNAP Sigma-Faktoren verwendet, existieren in Eukaryoten basale Transkriptionsinitiationsfaktoren, wie TBP, TFIID (TBP und TAFs), TFIIA, TFIIB, TFIIE, TFIIF und TFIIH [23]. Das archaeelle Transkriptionssystem stellt eine vereinfachte Version des eukaryotischen Systems dar und beschränkt sich auf die Verwendung der basalen Transkriptionsfaktoren TBP, TFB und TFE [4]. In Bakterien bindet der Sigma-Faktor  $\sigma^{70}$  an das

*coiled-coil-motif* der RNAP Clamp [24], während in Eukaryoten und Archaeen das regulatorische Protein TFIIE bzw. TFE an die Spitze der RNAP Clamp während der Initiation assoziiert [22, 25]. Daneben bietet die RNAP Clamp auch für den in allen drei Domänen des Lebens einzigen konservierten Elongationsfaktor NusG (Bakterien) bzw. Spt5 (Eukaryoten, Archaeen) [13] eine Bindungsstelle, der sich diese kompetitiv mit TFE teilt [22]. Die Transkription ist ein sehr regulierter Prozess, der viele Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren beinhaltet und in einer Modulation der RNA Polymerase resultiert, die so die einzelnen Phasen des Transkriptionszyklus kontrolliert [26].

Die Änderungen der RNAP Struktur liegen im einstelligen nm - Bereich und die bisher aus den Röntgenstrukturen und Kryo-Elektronenmikroskopie gewonnenen Daten liefern nur ein statisches Bild der RNAP Struktur. Der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET), der oft als molekulares Lineal bezeichnet wird [27], ist in Verbindung mit der Einzelmolekülmikroskopie deshalb eine geeignete Methode, um diese strukturellen Veränderungen (in Echtzeit) aufzulösen. Die Einzelmolekülmikroskopie erlaubt im Gegensatz zu Ensemblemessungen Subpopulationen, konkurrierende Reaktionswege und kurzlebige Zwischenzustände aufzudecken [28], während Ensemblemessungen nur Information über die mittleren Eigenschaften enthalten [29]. Chakraborty *et al.* konnten 2012 für die bakterielle RNAP Konformationsänderungen der Clamp mit Hilfe von Einzelmolekül-FRET-Lösungsmessungen nachweisen [12]. Die Position der Clamp wurde in einer freien RNAP, in der Initiations- und Elongationsphase des Transkriptionszyklus bestimmt. Es wurde gezeigt, dass die Clamp in einer freien RNAP und in Verbindung mit dem  $\sigma$ -Faktor (Holoenzym) drei unterschiedliche Konformationen annehmen kann, welche hauptsächlich in einer offenen Konformation vorliegt. Diese offene Konformation lässt das Laden der DNA in das aktive Zentrum der RNAP zu. Des Weiteren wurde gezeigt, dass nach Laden der DNA sich die RNAP Clamp über den DNA-Bindungskanal schließt und dies mit einer simultanen Rotation der Clamp einhergeht. Das Schließen der Clamp könnte die hohe Stabilität des offenen Prä-Initiationskomplexes sowie die Prozessivität in der Elongationsphase erklären.

Ziel dieser Arbeit war es, die Konformation der archaeellen RNAP Clamp in den verschiedenen Stufen des Transkriptionszyklus und in Abhängigkeit von regulierenden Transkriptionsfaktoren mit Hilfe von Einzelmolekül-FRET zu bestimmen. Die Struktur der archaeellen RNA Polymerase zeigt eine hohe Homologie zur RNAPII-Struktur und ist somit komplexer als die der bakteriellen RNA Polymerase. Der größte Unterschied liegt dabei in den Untereinheiten Rpo4/7 bzw. Rpb4/7, die in Bakterien nicht vorhanden sind und welche einen Einfluss auf die Konformation der Clamp haben. Im Gegensatz zur eukaryotischen RNAP hat die archaeelle RNAP den Vorteil, dass sie sich rekombinant in *Escherichia coli* (*E. coli*) exprimieren und *in vitro* aus ihren zwölf Untereinheiten

zusammensetzen lässt [30], was bei der eukaryotischen RNAPII bisher fehlschlug. Nicht nur die RNA Polymerase an sich ähnelt der eukaryotischen, sondern auch das



**Abbildung 1.1:** **(A)** Der Einbau der unnatürlichen Aminosäure in die RNAP Untereinheiten Rpo1' und Rpo2'' erfolgt mit Hilfe der *nonsense-suppression* Strategie. Die ortsspezifische Integration des Stopp-Codons TAG in die Gensequenz des Proteins und anschließende Koexpression mit dem Plasmid, das eine orthogonale Aminoacyl-tRNA Synthetase und die passende tRNA enthält, führt zum Volllängenprodukt des Proteins. Die unnatürliche Aminosäure kann spezifisch via Staudinger-Ligation mit Fluorophoren markiert werden. Für die Herstellung einer dreifach markierten RNAP, wird die Untereinheit Rpo11 über das natürlich vorkommende Cystein mit einem Biotin gekoppelt. Die Faltung der vollständigen RNAP erfolgt über die Assemblierung der einzelnen zwölf Untereinheiten, das einem denaturierenden-renaturierenden Protokoll folgt [30] **(B)** Die korrekt assemblierten RNAPs können anschließend auf Einzelmolekülebene untersucht und die Bewegung der RNAP Clamp über Bestimmung der FRET-Effizienzen verfolgt werden. **(C)** Darstellung der einzelnen FRET-Effizienzen in einem Histogramm, aus dem die mittleren FRET-Effizienzen sowie die Verteilung der Populationen ausgelesen werden können.

ganze Transkriptionssystem hat sehr starke strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit mit den Kernelementen des eukaryotischen Transkriptionssystems [10]. Die archaeele Transkriptionsmaschinerie kann also als Modellsystem für das eukaryotische Transkriptionssystem verwendet werden [4]. Insgesamt können mit Hilfe des archaeele

Transkriptionssysteme, im Vergleich zum bakteriellen, komplexere Fragestellungen untersucht werden, wie z.B. der Einfluss von TFE auf die Position der RNAP Clamp.

Die in dieser Arbeit verwendete RNA Polymerase stammt aus dem archaeellen Organismus *Methanocaldococcus jannaschii*, welcher 1983 entdeckt wurde. Der Organismus stammt aus dem unter Wasser gelegenen hydrothermalen „weißen Rauchern“ und war das erste Archaeon, dessen Genom vollständig sequenziert wurde [31]. Der Organismus lebt bei hohen Temperaturen (ca. 85°C) und gehört somit zu den thermophilen Organismen. Aufgrund der Assemblierung der RNAP aus ihren einzelnen Komponenten [30] können einzelne Untereinheiten modifiziert werden, sodass fluoreszenzbasierte Messungen durchgeführt werden können. Um einzelne Moleküle mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops zu detektieren, müssen diese vorher spezifisch mit fluoreszierenden Farbstoffmolekülen markiert werden (s. Abbildung 1.1)

Untersucht wurde die Änderung des Abstandes zwischen der Spitze der RNAP Clamp und der dazu gegenüberliegenden Seite, die als Referenzpunkt diente, in Abhängigkeit von den Transkriptionsfaktoren TFE und Spt4/5, der RNAP Untereinheitenzusammensetzung, den verschiedenen Nukleinsäuren und den Nukleotiden. Um die Abstandsänderung auszulesen, wurden an der Spitze der Clamp und am Referenzpunkt zunächst ortsspezifisch unnatürliche Aminosäuren eingefügt und diese mit Hilfe der Staudinger Ligation mit Fluorophoren markiert. Zur Immobilisierung der RNA Polymerase erfolgte eine weitere Modifikation mittels Cystein-Maleimid-Reaktion mit Biotin. So wurde die Position der RNAP Clamp in einer freien RNAP, einer RNAP als Teil eines Prä-Initiationskomplexes und als Teil eines Elongationskomplexes charakterisiert sowie die allosterische Modulation der RNAP Clamp durch TFE und Spt4/5 bestimmt.

## 2 Theoretische Grundlagen

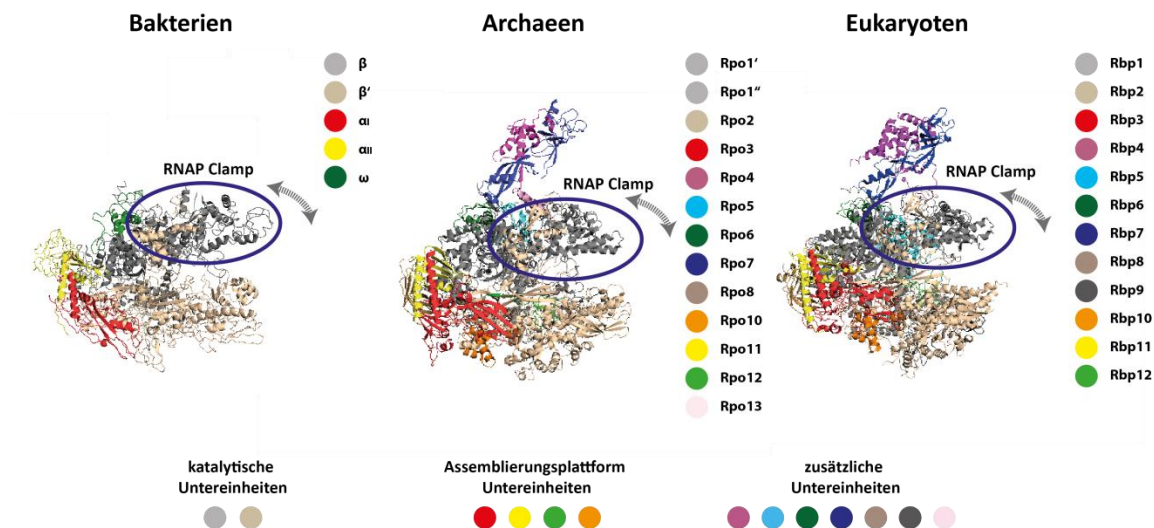
### 2.1 Biologische Grundlagen

#### 2.1.1 Funktion und Zusammensetzung der RNA Polymerase

RNA Polymerasen sind Enzyme, die RNA anhand einer DNA-Matrize synthetisieren (Transkription). Die Synthese der RNA in 5' - 3' - Richtung erfolgt, indem die RNAP die Ribonukleosidtriphosphate (NTPs) bindet und durch Abspalten des Pyrophosphats die verbleibenden Nukleosidmonophosphate polymerisiert. Im Gegensatz zu den Eukaryoten, die mehrere RNAPs besitzen [32], um die Ribosomale-RNA, Boten (*messenger*)-RNA und Transfer-RNA zu synthetisieren, verwenden Archaeen und Bakterien nur eine RNAP, die alle Formen der RNA transkribiert [18]. Dennoch sind diese RNAPs, die aus multiplen Untereinheiten bestehen, in allen drei Domänen (Bakterien, Archaeen, Eukaryoten) in ihrer Struktur und Funktion stark konserviert [4, 33], wobei die RNAPs aus Archaeen und Eukaryoten aus homologen Untereinheiten der bakteriellen Untereinheiten  $\beta$ ,  $\beta'$ ,  $\alpha$ ,  $\omega$  bestehen und darüber hinaus zusätzliche Untereinheiten aufweisen, die die Funktionalität des Enzyms beeinflussen und eine Interaktionsfläche für zusätzliche Interaktoren bieten.

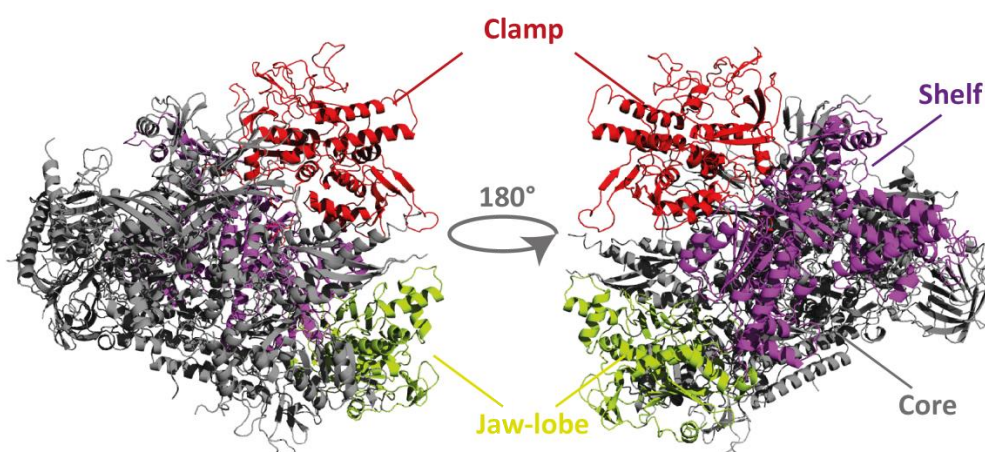
Die Hauptelemente der RNAP sind in allen drei Domänen ähnlich strukturiert und können in drei funktionelle Klassen eingeteilt werden, welche sich aus der Assemblierungsplattform, den katalytischen Untereinheiten und den zusätzlichen Untereinheiten zusammensetzen [13, 34] (s. Abbildung 2.1.1). Die RNAP bildet eine Struktur, die einer Krebsschere ähnelt. Die zwei Scheren der RNAP werden aus den katalytischen Einheiten (grau, beige) gebildet und beinhalten das aktive Zentrum der RNAP. Die kleineren Untereinheiten (rot, gelb, grün, orange) bilden die Assemblierungsplattform der RNAP [30]. Diese Zusammensetzung aus katalytischen Untereinheiten und der Assemblierungsplattform bildet die minimale Konfiguration, um aktive RNA Polymerasen zu erhalten [4]. Daneben gibt es zusätzliche kleine Untereinheiten, die je nach Organismus variieren und nicht für die RNA-Polymerisation notwendig sind [4], jedoch Bindungsstellen für Nukleinsäuren und Transkriptionsfaktoren besitzen [22, 35-37] und für die Verknüpfung von Untereinheiten unverzichtbar sind [22]. Der größte Unterschied zwischen den bakteriellen und eukaryotischen/archaeellen RNAPs ist die *Stalk*-Domäne, ein Heterodimer, das aus den Untereinheiten Rbp4/7 bzw. Rpo4/7 gebildet wird [21]. In Archaeen ist diese Domäne nicht zwingend für die Initiation der Transkription notwen-

dig und Polymerasen, bei denen diese Untereinheiten fehlen, sind weiterhin zur RNA-Synthese befähigt [30]. Jedoch wird die Prozessivität der RNAP durch diese Domäne erhöht [38].



**Abbildung 2.1.1:** Gezeigt ist die Kristallstruktur der bakteriellen RNAP (*Thermus aquaticus*; PDB: 116V), der archaeellen RNAP (*Sulfolobus shibatae*; PDB: 2WAQ) und die der eukaryotischen RNAP (*Saccharomyces cerevisiae*; PDB: 1WCM). Die Clamp ist eine flexible Domäne innerhalb der RNAP und ist in allen drei Domänen des Lebens konserviert.

Die RNAP setzt sich aus vier Elementen - Clamp (s. Kapitel 2.1.2), *jaw-lobe*-, *shelf*-, *core-module* – zusammen [14] (s. Abbildung 2.1.2), wobei die ersten drei Elemente beweglich sind.



**Abbildung 2.1.2:** Zusammensetzung der RNA Polymerase (*Saccharomyces cerevisiae*; PBD: 1150) aus den vier flexiblen Elementen: Clamp (rot), *shelf*- (violett), *jaw-lobe*- (gelb) und *core-module* (grau).

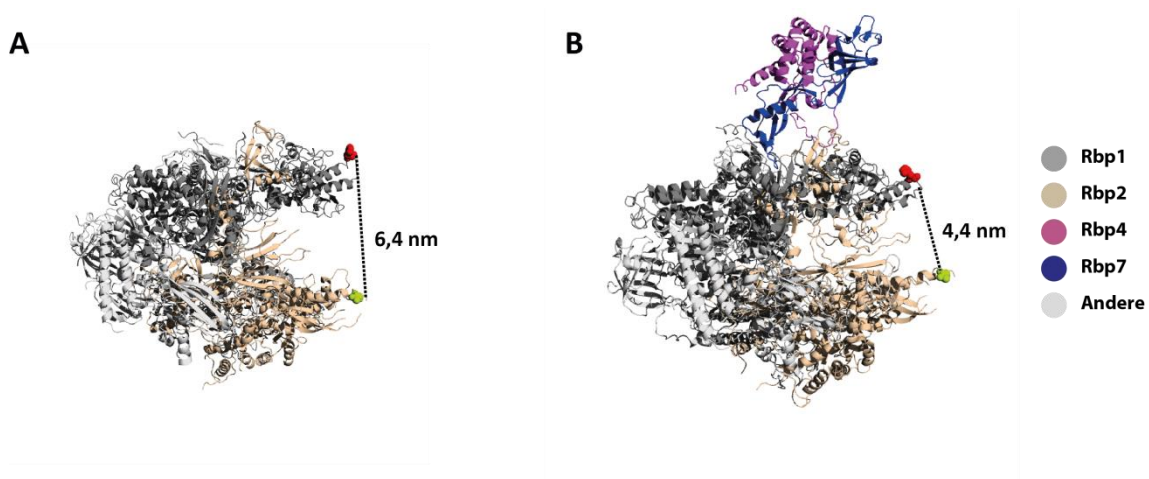


Im aktiven Zentrum der RNAP befinden sich die *bridge-helix*, die in allen drei Domänen des Lebens konserviert ist [39] und der *trigger-loop*. Beide sind für die Platzierung des richtigen Nukleotids im aktiven Zentrum verantwortlich sowie an der Translokation der RNA beteiligt [7, 40, 41]. Die RNAP aus dem Organismus *Methanocaldococcus jannaschii* besteht aus zwölf Untereinheiten und hat ein Molekulargewicht von ca. 370 kDa. Die katalytischen Untereinheiten werden aus Rpo1', Rpo1'', Rpo2' und Rpo2'' gebildet. Für eine effiziente Assemblierung werden die Untereinheiten Rpo3, Rpo10, Rpo11 und Rpo12 benötigt, die einen stabilen Komplex bilden [30] (Assemblierungsplattform). Daneben findet sich die zusätzliche Untereinheit Rpo5, die bei der Auftrennung der DNA assistiert und Rpo6, die als Verknüpfungprotein zwischen dem Hauptelement und der *stalk*-Domäne fungiert [42]. Diese nimmt mehrere Funktionen innerhalb des Transkriptionszyklus ein. Da bisher keine Kristallstruktur der RNAP aus dem Organismus *Methanocaldococcus jannaschii* verfügbar ist, wird die RNAP Struktur aus *Sulfolobus shibatae* exemplarisch gezeigt (s. Abbildung 2.1.1).

### 2.1.2 Die RNA Polymerase Clamp

Eine der Domänen der RNAP - die RNAP Clamp - ist besonders flexibel und ist ein regulatorischer „Hotspot“, d.h. sie ist in Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren involviert [22, 43]. Es wird angenommen, dass die Clamp Domäne große konformationelle Änderungen während des Transkriptionszyklus durchläuft [44]. Die Kristallstrukturen von RNAPII aus *Saccharomyces cerevisiae* zeigen, dass die Clamp in einer nukleinsäurefreien RNAP abhängig von ihrer Untereinheiten-Komposition zwei unterschiedliche Konformationen annehmen kann [14, 45]. In einer RNAP, in der die Untereinheiten Rpb4/7 (analog zu Rpo4/7) fehlen und die RNAP deshalb nur aus zehn Untereinheiten besteht, hat die Clamp eine offene Position, während die RNAP Clamp in der 12-Untereinheiten RNAP in einer geschlossenen Position vorliegt (s. Abbildung 2.1.3).

Weitere RNAP Kristallstrukturen aus anderen Organismen, wie z.B. den archaeellen Organismen *Sulfolobus shibatae* und *Sulfolobus solfataricus* [10] zeigen die RNAP Clamp ebenfalls in einem geschlossenen Zustand, während in der Kristallstruktur der archaeellen RNAP aus *Thermococcus kodakarensis* die Clamp eine offene Konformation einnimmt [46]. Die letztgenannten RNAPs enthalten alle die Untereinheiten Rpo4/7. Trotz der unterschiedlichen Ergebnisse wird weiterhin angenommen, dass die Untereinheiten Rpb4/7 (analog in Archaeen: Rpo4/7) die RNAP Clamp in einer geschlossenen Position halten [16].

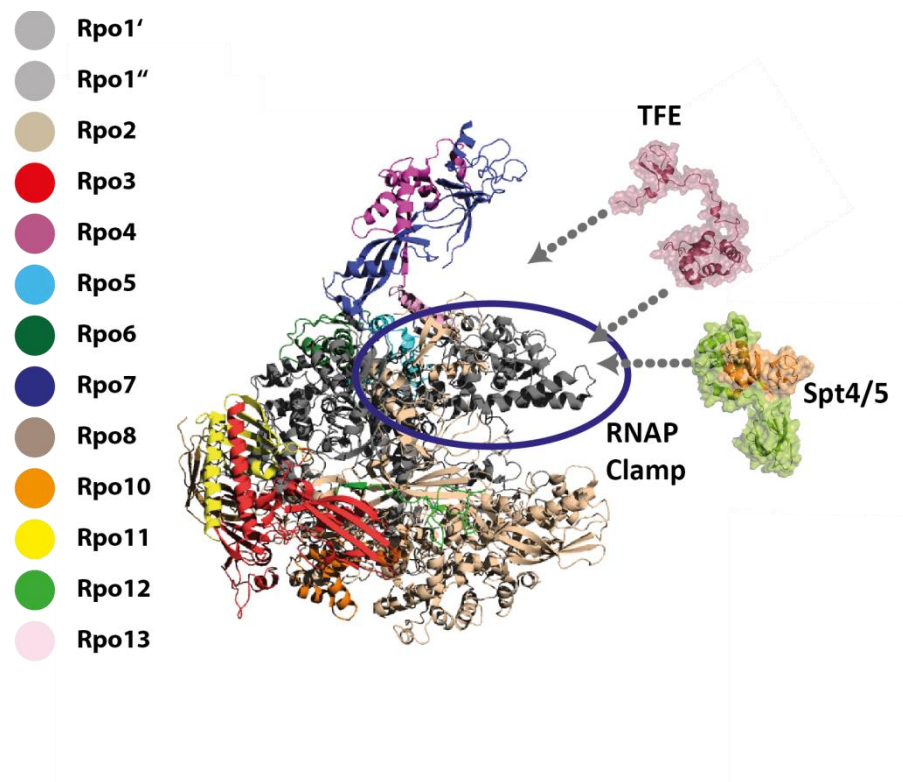


**Abbildung 2.1.3:** Kristallstrukturen der RNA Polymerasen aus *Saccharomyces cerevisiae* bestehend aus (A) 10 Untereinheiten (PDB: 1I50) und (B) 12 Untereinheiten (PDB: 1WCM). Der Abstand zwischen der Clamp und der dazu gegenüberliegenden Seite wird durch die Untereinheiten Rbp4/7 beeinflusst und verringert sich von 6,4 nm auf 4,4 nm. Die markierten Aminosäurepositionen sind in Rbp1: H282 (rot) und in Rbp2: T435 (grün).

Aufgrund der Komplexität des Prä-Initiationskomplexes existieren bisher keine Kristallstrukturen, sodass die Position der Clamp nicht nachvollzogen werden kann. Jedoch lieferte die Kryo-Elektronenmikroskopie die Struktur eines humanen Prä-Initiationskomplexes und eines aus *Saccharomyces cerevisiae* und zeigte, dass die RNAP Clamp beweglich ist [47, 48]. Ist die RNAP aus dem Organismus *Saccharomyces cerevisiae* Teil eines Elongationskomplexes, so weist die Clamp in den Kristallstrukturen eine geschlossene Konformation auf [17]. Lösungsmessungen an der bakteriellen RNAP Clamp mittels FRET zeigten die Clamp in einer freien RNAP in einem offenen Zustand, während im Prä-Initiationskomplex und Elongationskomplex sich diese schließt [12].

Da sich aber die bakterielle RNAP aufgrund ihrer Untereinheitenzusammensetzung von der archaellen/eukaryotischen RNAP unterscheidet und die Transkriptionsfaktoren größtenteils nicht konserviert sind [4], kann nur schwer ein Vergleich zwischen diesen Organismen gezogen werden. Neben den Nukleinsäuren haben auch verschiedene Transkriptionsfaktoren (z.B. TFE, Spt4/5) einen Einfluss auf die Position der Clamp und könnten diese möglicherweise verändern, da sie direkt mit der RNAP Clamp interagieren (s. Abbildung 2.1.4). Eine der zwei Bindungsstellen des Transkriptionsfaktors TFE liegt an der Spitze der RNAP Clamp [49] und könnte somit die Konformation der Clamp beeinflussen. Auch der Elongationsfaktor Spt4/5 assoziiert an die RNAP Clamp [43, 50, 51] und spannt sich über den DNA-Bindungskanal, sodass die DNA-Matrize fest in den DNA-Bindungskanal positioniert wird und das Öffnen der Clamp verhindert wird.

Dadurch wird die Prozessivität der Transkription, indem das Pausieren der RNAP während der Elongation verringert wird, erhöht [52].



**Abbildung 2.1.4:** Kristallstruktur der RNA Polymerase aus *Sulfolobus shibatae* (PDB:2WAQ). Die Faktoren TFE und Spt4/5 interagieren beide mit der Spitze der RNAP Clamp.

### 2.1.3 Transkriptionsfaktoren

In Archaeen existieren zwei basale Transkriptionsfaktoren - das TATA-bindende Protein (TBP) und Transkriptionsfaktor B (TFB) - die zwingend notwendig sind, um die RNA Polymerase zur Promoter-DNA zu rekrutieren [13, 53, 54]. Zusätzlich dazu wird die RNAP durch einen dritten Faktor - den Transkriptionsinitiationsfaktor E (TFE) und den Elongationsfaktor Spt4/5 reguliert (s. Abbildung 2.1.5).

TBP besitzt eine sattelförmige Struktur, die sich insgesamt aus 10  $\beta$ -Faltblättern und 4  $\alpha$ -Helices zusammensetzt. Mit der Einkerbung, an dessen äußeren Enden sich zwei Paare von Phenylalanin-Resten befinden, greift TBP um das TATA-Element der Promoter-DNA, was zu einer Aufweitung der DNA Doppelhelix und somit zu einer Biegung dieser um etwa 90° führt [55-57]. Die TATA-Box besteht aus 8 Basenpaaren, die sich ca. 20 Basenpaare stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt befindet und in fast allen archaeellen Promotoren vorhanden ist [58]. Die Interaktion zwischen TBP und der Promoter-DNA basiert in Archaeen auf einer hydrophoben Wechselwirkung zwischen

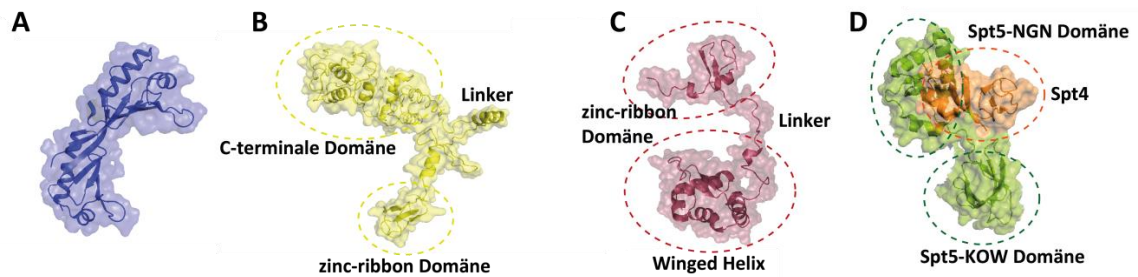
den neutral geladenen Aminosäuren in TBP und den Basen der DNA, welche durch höhere Salzkonzentrationen und Temperaturen noch verstärkt wird [55]. Die Bindung zwischen TBP und der DNA und das daraus resultierende Biegen ist sehr dynamisch, wie durch Einzelmolekülexperimente gezeigt werden konnte [55, 59].

Der zweite benötigte Faktor ist TFB, welches wie das eukaryotische Homolog TFIIB, aus zwei Domänen, die durch eine Linker-Region miteinander verbunden sind, besteht. Die C-terminale Domäne bindet an TBP und die DNA im sogenannten BRE-Abschnitt (TFB *responsive element*), der sich der TATA-Box stromaufwärts anschließt. Am N-Terminus befindet sich die *zinc-ribbon*-Domäne, die aus mehreren Motiven besteht, welche am Binden an die RNAP Untereinheiten Rpo12, Rpo10 und Rpo6 [53] sowie beim Auftrennen der DNA und der Wahl des Transkriptionsstartpunktes beteiligt sind [60]. TFB fungiert daher als ein Verbindungsprotein zwischen der DNA und der RNAP. TFB ist ursächlich für die Rekrutierung der RNAP verantwortlich und in Abwesenheit von TFB kann kein Prä-Initiationskomplex gebildet werden. Der B-Finger von TFB reicht im offenen Prä-Initiationskomplex tief in das aktive Zentrum der RNAP und stabilisiert so den, in das aktive Zentrum geladenen, kodogenen Strang [36].

Der dritte Transkriptionsfaktor TFE besteht aus zwei Domänen, wobei die *winged helix* Domäne an das RNAP Clamp *coiled-coil-motif* und die *zinc-ribbon* Domäne an die RNAP Untereinheiten Rpo4/7 bindet [22, 49]. Für die *in vitro* Transkription ist TFE nicht essentiell, aber es stabilisiert den Prä-Initiationskomplex und stimuliert die Initiationsrate [61]. Die *winged helix* Domäne ist in der Interaktion mit dem nicht-kodogenen Strang der DNA involviert [61]. Da TFE das DNA-Schmelzen [35] am Transkriptionsstartpunkt fördert, lässt es die Vermutung zu, dass TFE den offenen Prä-Initiationskomplex stabilisieren könnte, indem es möglicherweise eine Re-Hybridisierung der Promoter-DNA verhindert [62].

NusG (Bakterien) bzw. Spt5 (Archaeen, Eukaryoten) ist der einzige Elongationsfaktor, der in allen drei Domänen des Lebens konserviert ist, welches die RNAP bei der RNA Synthese unterstützt [63]. Spt5 besteht aus zwei Domänen, der N-terminalen Domäne (NGN) und der C-terminalen Kyprides-Onzonis-Woese (KOW) Domäne, die durch einen flexiblen Linker miteinander verbunden sind. Anders als in Archaeen ist Spt5 in Eukaryoten größer, da es multiple KOW-Domänen besitzt [63]. Zusätzlich bildet Spt5 in Archaeen und Eukaryoten mit dem Faktor Spt4 ein Heterodimer aus. Spt4 hat einen stabilisierenden Einfluss auf die Spt5 NGN Domäne, wobei weitere Funktionen noch unbekannt sind [64]. Spt5 bindet mit der NGN Domäne durch eine hydrophobe Wechselwirkung an die RNAP Clamp (*coiled-coil-motif*) [43]. Spt4/5 spannt über den DNA Bindungskanal der RNAP, sodass die DNA in der RNAP stabilisiert wird und eine ver-

frühe Dissoziation der RNAP von der DNA-Matrize verhindert wird. Dadurch erhöht Spt4/5 die Prozessivität der RNAP [50].



**Abbildung 2.1.5:** Transkriptionsfaktoren. **(A)** Kristallstruktur von TBP aus *Methanocaldococcus jannaschii* (PDB: 2Z8U) **(B)** Das Homologiemodell von TFB aus *Methanocaldococcus jannaschii* basierend auf der TBP-TATA-TFB Struktur aus *Pyrococcus woesei* (PDB: 1D3U) und der TFIIIB-Kristallstruktur aus *Saccharomyces cerevisiae* (PDB: 4BBR) **(C)** Das Homologiemodell von TFE aus *Methanocaldococcus jannaschii*, das auf der Kristallstruktur der N-terminalen Domäne von TFE aus *Sulfolobus solfataricus* (PDB: 1Q1H) und auf der NMR-Struktur des humanen TFIIIE $_{\alpha}$  (PDB: 1VD4) basiert (Homologiemodell wurde in [22] gezeigt) **(D)** Kristallstruktur von Spt4/5 aus *Pyrococcus furiosus* (PDB: 3P8B)

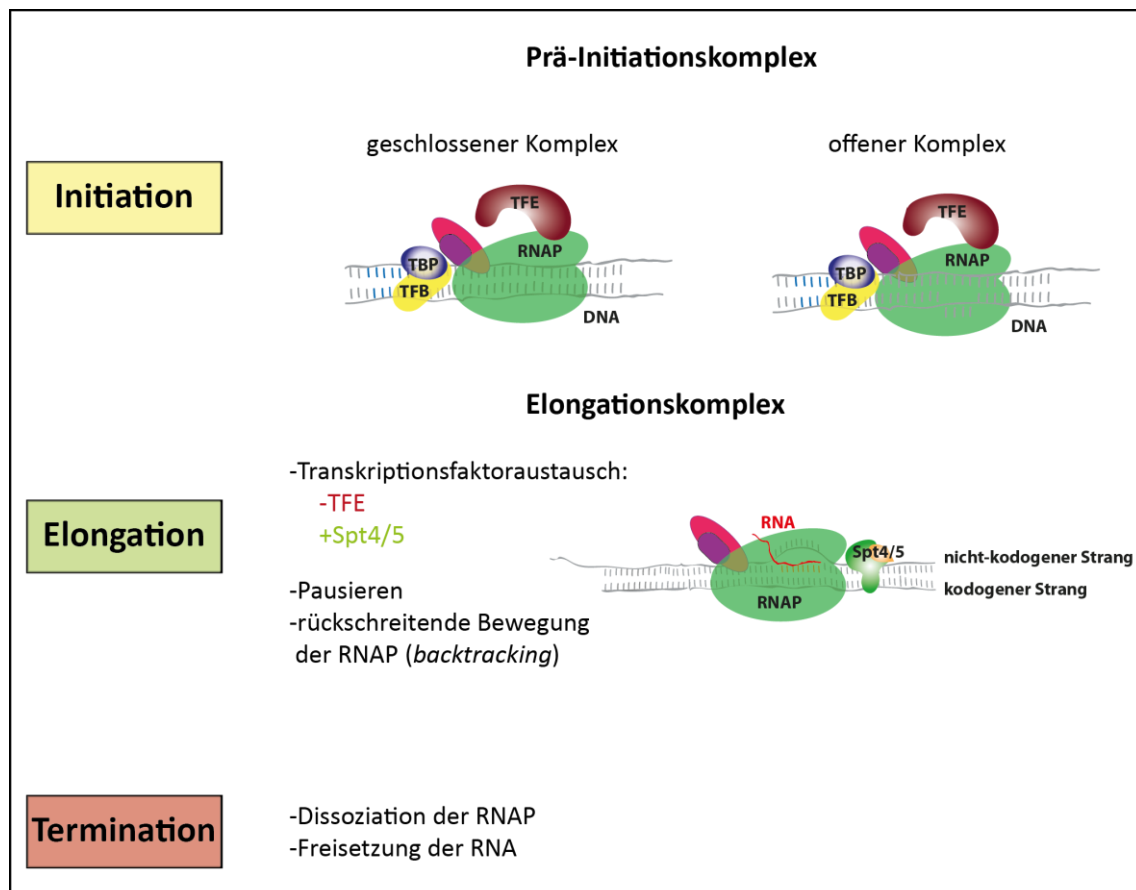
Deletionsstudien am archaeeellen Spt4/5 zeigten auf, dass die Spt5 NGN-Domäne essentiell für den stimulierenden Effekt auf die Transkription der RNAP ist. Die Domäne allein reicht allerdings dafür nicht aus, sondern diese muss zunächst einen Komplex mit entweder Spt4, Spt4/Spt5-KOW oder Spt5-KOW bilden [43]. Spt4/5 kann auch an eine freie RNAP assoziieren, und den DNA Bindungskanal somit für die DNA blockieren, sodass die DNA nicht mehr in das aktive Zentrum der RNAP geladen werden kann [22] und die Transkription unterdrückt wird.

#### 2.1.4 Transkriptionszyklus

Der Transkriptionszyklus der RNAP kann in drei Phasen unterteilt werden: Initiation, Elongation und Termination (s. Abbildung 2.1.6).

Die Initiation beginnt mit dem Erkennen und Binden von TBP an die Promoter-DNA, die das TATA- und das BRE-Element enthält. Durch Binden von TBP an die Promoter-DNA, wird diese gebogen und TFB erkennt den DNA-TBP-Komplex. TFB bindet am BRE-Element der Promoter-DNA, wodurch der Komplex stabilisiert wird und die Richtung der Transkription vorgegeben wird [65]. Erst jetzt kann die RNAP an den DNA-TBP-TFB-Komplex binden, sodass der Prä-Initiationskomplex gebildet wird. Dies ist die minimale Konfiguration, die benötigt wird, um die Transkription zu starten. Die Promoter-DNA liegt zunächst in geschlossener Form vor (geschlossener Komplex) und wird anschließend am Transkriptionsstartpunkt (+1) geschmolzen, sodass eine Transkriptionsblase von etwa 8 Nukleotiden (+1 - -7) entsteht (offener Komplex), welche durch KMnO<sub>4</sub> Studien anhand des archaeeellen Transkriptionssystems gezeigt wurde [49]. Der

kodogene Strang ist dabei in das aktive Zentrum der RNAP geladen und der nicht-kodogene Strang wird außerhalb der RNAP entlanggeführt [49]. Dies wurde mit Hilfe von Einzelmolekül-FRET-Messungen in Kombination mit dem Nano-Positions-System gezeigt. Zusätzlich zu den beiden Transkriptionsfaktoren existiert im Organismus *Methanocaldococcus jannaschii* noch ein dritter Transkriptionsfaktor: Transkriptionsfaktor E (TFE). Dieser ist nicht zwingend notwendig für das Starten der Transkription, stimuliert aber das DNA-Schmelzen am Transkriptionsstartpunkt und stabilisiert den offenen Komplex.



**Abbildung 2.1.6:** Der Transkriptionszyklus besteht aus drei Phasen: Initiation, Elongation und Termination. Zunächst wird die RNAP auf die Promoter-DNA durch die Transkriptionsfaktoren TBP und TFB rekrutiert, wobei die DNA vom geschlossenen zum offenen Komplex übergeht. Dieser wird von TFE weiter stabilisiert. In der Elongationsphase kommt es zum Transkriptionsfaktorwechsel: TFE wird von Spt4/5 verdrängt. Spt4/5 erhöht die Prozessivität der RNAP und verringert das Pausieren der RNAP. Im letzten Schritt, der Termination, dissoziiert die RNAP und die RNA wird freigesetzt.

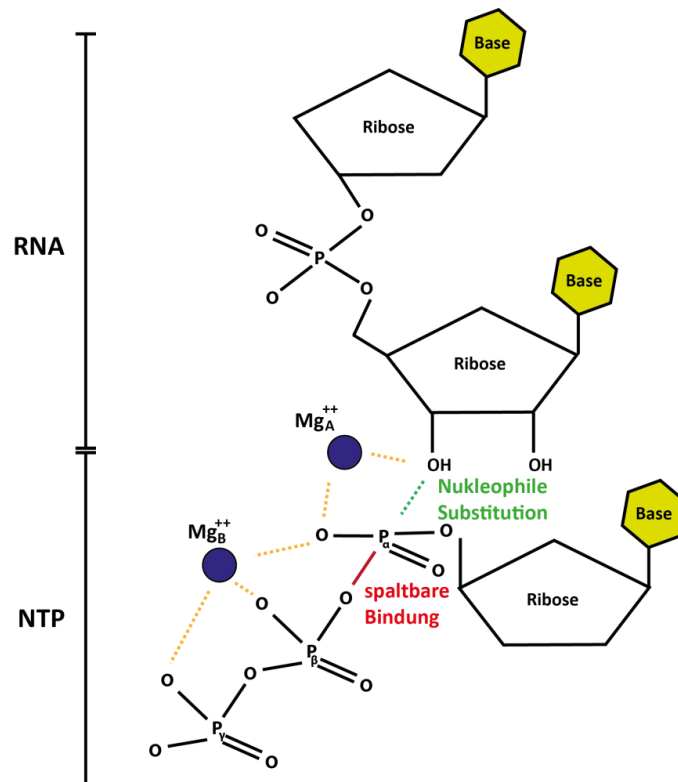
Im Gegensatz zu der eukaryotischen RNAP, benötigt die archaeele RNAP keine zusätzliche Energie sowie keine ATP-abhängige Helikase, um den offenen Initiationskomplex zu bilden. Die RNAP synthetisiert anschließend zunächst kurze (3 - 9 Nukleotide) RNA-Stränge (abortive Initiation), wobei der kodierende Strang in die RNAP gezogen wird, welches anhand der bakteriellen RNAP gezeigt wurde (*DNA scrunching*)

[66]. Die kurzen RNA-Stränge dissoziieren wieder, ohne, dass die RNAP den Promoter verlässt [67]. TFB wird dabei freigesetzt und für den nächsten Transkriptionsprozess wiederverwertet [68].

Nach Verlassen des Promotors, wird die DNA in der Elongationsphase in 3'-5'-Richtung abgelesen und in RNA umgeschrieben, indem Pyrophosphate von Nukleosidtriphosphaten hydrolysiert werden [5]. Dies basiert auf dem zwei-Metallionen-Mechanismus. Dabei werden zwei Magnesium-Ionen  $Mg_A$  und  $Mg_B$  benötigt, wobei nur eins der beiden Ionen im aktiven Zentrum der RNAP gebunden ist. Die 3'-OH-Gruppe der RNA greift die  $\alpha$ -Phosphatgruppe des NTP-Substrats über eine  $SN_2$  nukleophile Substitutionsreaktion an [44]. Dessen fünfwertiges Zwischenprodukt wird durch die zwei Magnesium-Ionen stabilisiert und es wird eine neue Phosphodiester-Bindung gebildet, während ein Pyrophosphat abgespalten wird (s. Abbildung 2.1.7) [69]. Die dabei freigesetzte Energie wird von der RNAP genutzt, um sich auf der DNA fortzubewegen [1]. Die dabei entstehende RNA wird durch den RNA Austrittskanal in der RNAP in Richtung der RNAP Untereinheiten Rpo4/7 geleitet [70]. Besitzt das DNA/RNA-Hybrid der Transkriptionsblase eine Länge von 8-9 Nukleotiden, so ist der Elongationskomplex stabil [71], während kürzere DNA/RNA-Hybride zu einem instabilen Elongationskomplex führen [72]. Die RNAP transkribiert dabei nicht kontinuierlich, sondern kann pausieren oder eine rückschreitende Bewegung durchführen (*backtracking*). Des Weiteren kommt es zu einem Transkriptionsfaktoraustausch: TFE wird durch den Elongationsfaktor Spt4/5 ersetzt. Beide Faktoren besetzen die gleiche Bindungsstelle an der RNAP- die RNAP Clamp, sodass durch unterschiedliche Bindungsaffinitäten der Faktoren während der Initiations- und Elongationsphase, TFE in der Elongationsphase durch Spt4/5 verdrängt wird [22]. Spt4/5 stimuliert die Elongation, indem es über einen allosterischen Mechanismus möglicherweise das aktive Zentrum durch Änderung der RNAP Clamp Position beeinflusst [43].

In der letzten Phase (Termination) erkennt die RNAP eine kurze Poly-U-Sequenz, was zum Abbruch der Transkription führt [73] und durch die Untereinheiten Rpo4/7 verstärkt wird [38]. Dabei dissoziiert die RNAP von der DNA, setzt das RNA-Transkript frei und der Zyklus kann erneut starten.





**Abbildung 2.1.7:** Mechanismus der RNA Polymerisation. Über eine Substitutionsreaktion zwischen der 3'-OH-Gruppe der RNA und des Nukleotides (NTP) und der anschließenden Stabilisierung des Zwischenprodukts durch die Magnesium-Ionen, wird das Pyrophosphat abgespalten, sodass sich eine Phosphodiester-Bindung bildet.

## 2.2 Genetische Integration von unnatürlichen Aminosäuren

Bei der Translation übersetzt das Ribosom die mRNA in eine Polypeptidkette, indem jeweils komplementäre, mit Aminosäuren beladene Transfer-RNAs (tRNA), die passenden Triplet-Codons auf der mRNA erkennen. Mit den vier Basenpaaren Adenin, Guanin, Cytosin und Uracil können insgesamt  $4^3 = 64$  mögliche Triplet-Codons erzeugt werden und da es nur 20 natürlich vorkommende Aminosäuren gibt, werden diese also als entartet (überbelegt) bezeichnet. Davon kodieren 61 Triplet-Codons eine Aminosäure, während die letzten drei verbleibenden Codons (*nonsense* Codon, Stopp-Codon) das Ende der Translation bestimmen.

Die Beladung der iso-tRNAs mit der passenden Aminosäure erfolgt spezifisch durch die Aminoacyl-tRNA Synthetase (aatRS), wobei die aatRS selbst spezifisch für jedes Aminosäure/tRNA-Paar ist. Somit existiert zu jeder Aminosäure auch eine passende Aminoacyl-tRNA Synthetase. Die so beladenen tRNAs erkennen ihre komplementäre Sequenz auf der mRNA und die einzelnen Aminosäuren werden solange durch die Peptidbindung miteinander verknüpft, bis eines der drei bakteriellen Stopp-Codons



(TAA, TGA, TAG) erreicht wird. Durch das Anbinden der Release-Faktoren 1 und 2 wird die Polypeptidkette freigesetzt.

Die Erweiterung des genetischen Codes durch die Verwendung von unnatürlichen Aminosäuren wird durch die *nonsense-suppression* erreicht. Das bedeutet, dass das *nonsense*-Codon in *E.coli* nicht als solches erkannt wird, sondern stattdessen die unnatürliche Aminosäure eingebaut wird. Dafür wird ein neues aaRS/tRNA-Paar benötigt, das orthogonal zum endogenen aaRS/tRNA-Paar ist. Das bedeutet, dass einerseits die neue tRNA nicht von der *E. coli* aaRS erkannt wird und andererseits, dass die tRNA die unnatürliche Aminosäure spezifisch erkennt. Ebenfalls ist eine aaRS erforderlich, die nur die orthogonale tRNA mit der unnatürlichen Aminosäure belädt und nicht mit einer der anderen 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren [74]. Des Weiteren wird ein *nonsense* Codon auf der mRNA benötigt. Häufig wird eines der prozentual gesehen am wenigsten genutzten Stopp-Codons ausgewählt: das Amber-Stopp-Codon TAG. Ein solches orthogonales tRNA/aaRS-Paar stammt z.B. aus dem archaeeellen Organismus *Methanocaldococcus jannaschii*. Das Anticodon der *Methanocaldococcus jannaschii* Tyrosin-tRNA (*Mj*tRNA<sup>Tyr</sup>) wurde zu CUA geändert, sodass dies zur Erkennung des Amber-Stopp-Codons auf der mRNA führt. Des Weiteren wurde die Aminosäurenbindungstasche der Tyrosin Aminoacyl-tRNA-Synthetase aus dem gleichen Organismus (*Mj*TyrRS) mutiert und so eine spezifische Erkennung der unnatürlichen Aminosäure erzielt [75, 76].

Zur rekombinanten Expression eines Proteins mit einer unnatürlichen Aminosäure in *E. coli* wurden die Zellen mit dem *Mj*Tyr-Plasmid und dem Expressionsvektor für das Zielprotein kotransformiert. Im Gen des Zielproteins wurde zuvor ein *nonsense* Codon an der gewünschten Stelle für die Integration der unnatürlichen Aminosäure eingefügt. Während der Expression des Proteins wird statt eines Translationsabbruchs durch den Release-Faktor 1 am Amber-Stopp-Codon die unnatürliche Aminosäure an dieser Stelle eingebaut. Der Einbau der unnatürlichen Aminosäure erfolgt jedoch nicht mit 100%-Effizienz, sondern steht in Konkurrenz zum Anbinden des Release-Faktors 1. Somit liegt die Einbaueffizienz zwischen 20 - 30% [77].

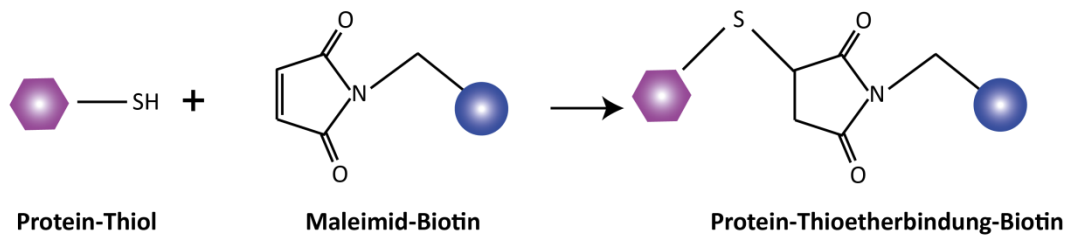
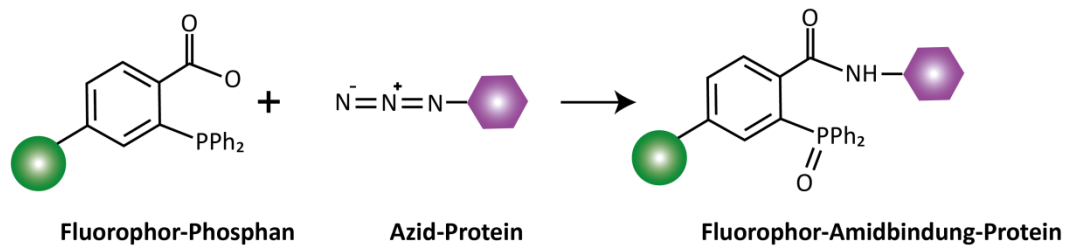
## 2.3 Markierungsstrategien für Proteine

Die einfachste und meist verbreitete Variante, um Proteine spezifisch mit einem Farbstoff oder Biotin zu markieren, ist die Reaktion zwischen einer Thiol- und Maleimidgruppe. Die Thiolgruppe der Cysteine im Protein reagiert spontan und spezifisch mit der Maleimidgruppe, die beispielsweise mit einem Fluoreszenzfarbstoff oder Biotin gekoppelt ist und bildet eine kovalente Thioetherbindung aus. Der optimale pH-Wert der Re-

aktion liegt zwischen 6,5 - 7,5. Da vor allem größere Proteine mehr als ein Cystein oder kleinere Proteine oft kein Cystein aufweisen, können entweder überschüssige Cysteine mittels Mutagenese entfernt oder fehlende Cysteine hinzugefügt werden. Für FRET-Messungen ist ein genau definierter Abstand zwischen den Fluorophoren essentiell. Eine zufällige Kopplung des Fluorophors an mehrere verfügbare Cysteine würde somit zu einer unerwünschten Mittelung der gemessenen FRET-Effizienz führen [78]. Farbstoffkopplung über die Cysteine funktioniert bei kleineren Proteinen sehr gut, da diese oft wenige bzw. keine Cysteine enthalten, allerdings können größere Proteine sehr viel mehr Cysteine besitzen und somit muss eine alternative Strategie zum ortsspezifischen Einbau von Fluoreszenzfarbstoffen gefunden werden.

Alternativ können deshalb Derivate von unnatürlichen Aminosäuren, die reaktive Gruppen enthalten, verwendet werden. Bei der Reaktion zwischen der Azidgruppe an der unnatürlichen Aminosäure *p*-Azido-L-phenylalanin und einem Phosphan-Derivat reagieren diese zu Phospha-Aza-Yliden. Werden diese durch Acylgruppen abgefangen, so bildet sich eine stabile Amidbindung aus [79] (Staudinger Ligation) (s. Abbildung 2.3.1). Diese Reaktion ist bioorthogonal, da Azide und Phosphane nicht in natürlich vorkommenden Zellen vorhanden sind und auch mit keiner der in diesen Zellen vorkommenden Biomolekülen reagieren [80].

Allgemein sollten die zu markierenden Aminosäuren im Protein auf der Oberfläche des Proteins liegen, um leichte Zugänglichkeit des Farbstoffs zu gewährleisten und die normale Funktion des Proteins sollte durch die Modifikation nicht beeinträchtigt sein. Zudem sollten keine Aminosäuren verändert werden, die in mehreren Organismen konserviert sind, da dadurch möglicherweise die Faltung/Funktion des Proteins gestört werden kann.

**A****B**

**Abbildung 2.3.1:** (A) Cystein-Maleimid-Reaktion (B) Staudinger-Ligation. Das Protein ist jeweils lila dargestellt, während das Biotin und der Fluorophor als blauer bzw. grüner Kreis gekennzeichnet sind.

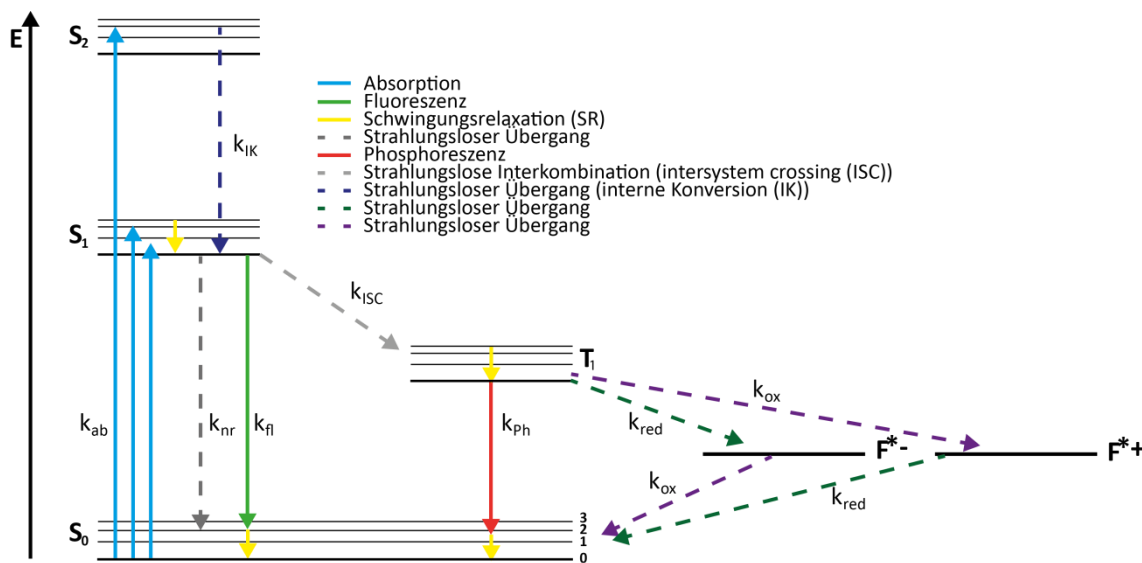
## 2.4 Photophysikalische Grundlagen

### 2.4.1 Absorption und Emission von Fluorophoren

Organische Fluorophore sind Moleküle, die ein delokalisiertes  $\pi$ -Elektronensystem besitzen und im Ultravioletten/Nahinfraroten-Spektralbereich absorbieren und emittieren. Fluorophore können quantenmechanisch durch das „Teilchen im Kasten Modell“ mit diskreten Energieniveaus in guter Näherung beschrieben werden. Die Absorption und Emission von Fluorophoren kann anschaulich mit Hilfe eines Jablonski Diagramms (s. Abbildung 2.4.1) dargestellt werden.

Ein Fluorophor kann durch Absorption eines Photons vom elektronischen Grundzustand  $S_0$  in eines der Vibrationsniveaus des elektronisch angeregten Singulett-Zustands  $S_1$  oder  $S_2$  angeregt werden, wenn die absorbierte Energie mindestens der Energie zwischen den beiden Energieniveaus  $S_0$  und  $S_1$  bzw.  $S_0$  und  $S_2$  entspricht. Da die Elektronenmasse gegenüber der Kernmasse sehr viel kleiner ist, sind die elektronischen Übergänge schneller, als die Kernbewegung (Born-Oppenheimer-Näherung). Daraus leitet sich das Franck-Condon-Prinzip ab, wonach die Übergänge zwischen den Niveaus vertikal verlaufen. Von einem angeregten Zustand aus relaxiert der Fluorophor strahlungslos ( $10^{-13}$  -  $10^{-11}$  s) in das niedrigste Vibrationsniveau von  $S_1$  oder  $S_2$  (Schwingungsrelaxation). Der Übergang vom Zustand  $S_2$  in den Zustand  $S_1$  wird interne Konversion ( $k_{IK}$ ) genannt und kann nur zwischen zwei Niveaus mit gleicher Spin-

Multiplizität stattfinden. Das Elektron im  $S_1$ -Zustand kann z.B. durch Aussenden eines Photons in den Grundzustand zurückkehren (Fluoreszenz,  $k_{fl}$ ). Da dies immer vom niedrigsten Vibrationsniveau aus geschieht, ist somit das Emissionsspektrum unabhängig von der Anregungswellenlänge (Kashas Regel). Eine weitere Möglichkeit, den  $S_1$ -Zustand zu entvölkern, ist der strahlungslose Übergang in den Triplett-Zustand  $T_1$  (strahlungslose Interkombination,  $k_{ISC}$ ). Da hier eine Spin Umkehr des Elektrons erfolgt, ist dieser Übergang laut der Spinauswahlregel ( $\Delta S=0$ ) quantenmechanisch verboten und die Relaxation in den Grundzustand dauert zwischen  $10^{-4}$  s bis zu einigen Stunden (Phosphoreszenz,  $k_{ph}$ ). Aufgrund der Schwingungsrelaxation im  $S_1$  und dem damit einhergehenden Energieverlust, sind die Emissionswellenlängen im Vergleich zu den Absorptionswellenlängen zu längeren Wellenlängen hin verschoben (Stokesche Regel). Neben den radiativen Prozessen, gibt es noch weitere nicht-radiative Prozesse, die zur Entvölkerung des angeregten Zustandes führen, wie z.B. Fluoreszenzlöschung, Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (s. Kapitel 2.4.3) und interne Konversion.



**Abbildung 2.4.1:** Vereinfachtes Jablonski-Diagramm. Dargestellt sind die Singulett ( $S_0$ ,  $S_1$ ,  $S_2$ )-, Triplett ( $T_1$ )- und die Radikalzustände eines Fluorophors ( $F^{*-}$ ,  $F^{*+}$ ) sowie die einzelnen Übergänge mit den jeweiligen Raten  $k$ .

Das Verhältnis zwischen der Rate der Fluoreszenzemission  $k_{fl}$  und der Summe aus  $k_{fl}$  und den nicht-radiativen Raten  $k_{nr}$  entspricht der Quantenausbeute eines Fluorophors  $\Phi_f$  (s. Gleichung (1)):

$$\Phi_f = \frac{k_{fl}}{k_{fl} + k_{nr}} \quad (1)$$

Diese Größe kann auch als das Verhältnis zwischen Anzahl der emittierten ( $N_{emittiert}$ ) und absorbierten Photonen ( $N_{absorbiert}$ ) beschrieben werden (s. Gleichung (2)):

$$\Phi_f = \frac{N_{emittiert}}{N_{absorbiert}} \leq 1 \quad (2)$$

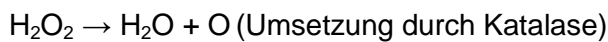
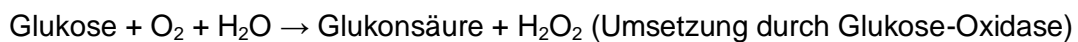
Die mittlere Zeit, welche ein Fluorophor den angeregten Zustand  $S_1$  besetzt, wird als Fluoreszenzlebensdauer  $\tau$  bezeichnet und ist durch folgende Gleichung (3) gegeben:

$$\tau = \frac{1}{k_{fl} + k_{nr}} \quad (3)$$

Häufig kommt es zu einer Depopulation des Triplett-Zustandes, indem eine Photochemische Reaktion zwischen dem angeregten Fluorophor und einem Sauerstoffmolekül stattfindet. Als Nebenprodukt wird jedoch ein Singulett-Sauerstoffradikal erzeugt, das bei Reaktion mit einem angeregten Fluorophor, zur irreversiblen Zerstörung (Photo-bleichen) des delokalisierten  $\pi$ -Elektronensystems des Farbstoffs führt [81] und was einen abrupten Verlust der Fluoreszenzintensität zur Folge hat [28].

Eine Möglichkeit, um das Fluoreszenzsignal zu stabilisieren, ist die Verwendung eines Sauerstoffentzugssystems bestehend aus Glukose-Oxidase und Katalase [82] und das reduzierende und oxidierende System (ROXS) [83]. Das Glukose-Oxidase und Katalase System wandelt Glukose und Sauerstoff in einem zwei-Stufen-Prozess in Glukonsäure und Wasser um (s. Reaktionsgleichung), sodass insgesamt dem System Sauerstoff entzogen wird [84]. Dies führt zu einer erheblichen Verringerung des Photobleichens.

Reaktionsgleichung [85]:



Die Probe sollte dabei möglichst von der Außenluft isoliert werden, da andernfalls der pH-Wert durch die Glukonsäure-Produktion kontinuierlich verringert wird [86]. Der Sauerstoffentzug allein reicht jedoch nicht aus, um ein stabiles Fluoreszenzsignal zu erhalten, da dadurch nur die Lebensdauer des Triplett-Zustandes verlängert ist [82] und der Fluorophor keine Photonen aussendet. Es kommt zum charakteristischen Blinken des Fluorophors, d.h. der Farbstoff wechselt kontinuierlich zwischen An- und Auszuständen, welche jeweils dem ersten angeregten Zustand und dem Triplett-Zustand zugeordnet werden können. Der Triplett-Zustand kann durch die Verwendung eines Reduktions- und Oxidationsmittels schnell entvölkert werden. Der Fluorophor wird durch das Reduktionsmittel reduziert und es entsteht ein Radikalanion ( $F^{\bullet-}$ ), welches durch das

Oxidationsmittel in den Grundzustand zurück gelangt. Analog dazu kann der Fluorophor durch das Oxidationsmittel erst oxidiert werden, was zu einer Radikalkation ( $F^{*+}$ ) führt, das anschließend durch das Reduktionsmittel reduziert wird. In dieser Arbeit wurde das Reduktionsmittel Trolox, ein Vitamin E-Analog, und seine oxidierte Form Trolox-Quinon, im millimolaren-Bereich eingesetzt. Trolox hat eine reduzierende Wirkung auf den angeregten Fluorophor und Trolox-Quinon, eine oxidierende Wirkung auf den Triplett-Zustand des Fluorophors [87]. So wird gemäß dem reduzierenden und oxidierenden Schema (ROXS) [88] der Triplett-Zustand ( $T_1$ ) durch das Reduktionsmittel (Trolox) entvölkert und der Fluorophor in einen Radikal-Zustand ( $F^{\cdot-}$ ) überführt. Von dort aus bewirkt das Oxidationsmittel (Trolox-Quinon) eine Depopulation zurück in den Grundzustand  $S_0$ , sodass der Fluorophor von neuem angeregt werden kann. Da die Übergänge vom Triplett-Zustand in den Radikalzustand und zurück in den Grundzustand schneller sind als die zeitliche Auflösung des Mikroskops, ergibt sich ein stabiles Fluoreszenzsignal.

#### 2.4.2 Fluoreszenzanisotropie

Emittierende Fluorophore können als strahlende Dipole beschrieben werden [89]. Sie besitzen ein Absorptions- und Emissions-Übergangsdipolmoment, welche durch die Struktur der Fluorophore gegeben sind. Trifft linear polarisiertes Licht auf eine fluoreszierende Probe, so ist die Emission ebenfalls linear polarisiert und der Grad der Änderung der Orientierung des Absorptions- und Emissions-Übergangsdipolmoments eines Fluorophors (Depolarisation) wird durch die Fluoreszenzanisotropie  $r$  ausgedrückt. Diese kann in Abhängigkeit des Winkels  $\beta$  (Winkel zwischen Absorptions- und Emissions-Übergangsdipolmoment) betrachtet werden (s. Gleichung (4)):

$$r = \frac{2}{5} \left( \frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} \right) \quad (4)$$

Die Grenzen der Fluoreszenzanisotropie liegen dementsprechend zwischen  $r = 0,4$  für  $\beta = 0^\circ$  und  $r = -0,2$  für  $\beta = 90^\circ$ . Die Fluorophore, deren Übergangsdipolmomente möglichst parallel zum elektrischen Feld (vektor) des absorbierten Lichts liegen, werden bevorzugt angeregt (Photos Selektion) [90]. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Fluorophor polarisiertes Licht absorbiert, ist proportional zu  $\cos^2 \theta$ , wobei  $\theta$  der Winkel zwischen dem Absorptions-Übergangsdipolmoment und dem elektrischen Feld des absorbierten Lichts ist.

Depolarisation kann einerseits durch die unterschiedliche Orientierung des Absorptions- und Emissionsübergangsdipolmoments eines Fluorophors erfolgen und andererseits durch die Rotationsdiffusion. Dabei rotiert der Fluorophor schneller als die Lebensdauer eines Fluorophors im angeregten Zustand und die Emission ist depolarisiert. Für einen freien Fluorophor in wässriger Lösung geht die Fluoreszenzanisotropie somit gegen Null [91]. Umgekehrt erhöht sich die Anisotropie, wenn der Fluorophor an ein Makromolekül (z.B. Protein) gekoppelt wird, da die Rotationszeit aufgrund der erhöhten molekularen Masse zunimmt ( $10^1 - 10^2$  ns). Dies kann beispielsweise ausgenutzt werden, um die Assoziation von zwei Proteinen zu messen [42].

Des Weiteren kann die Anisotropie als Maß für die freie Beweglichkeit eines an ein Protein gekoppelten Fluorophors verwendet werden. Liegt der Anisotropie-Wert unter 0,2, so kann eine freie Rotation des Fluorophors angenommen werden ( $\kappa^2$  liegt dann nahe bei 2/3. Vergleiche Kapitel 2.4.3) [86]. Ist der Anisotropie-Wert höher als 0,2, so ist die Bewegung des Fluorophors eingeschränkt. Dieser Faktor muss bei der Berechnung der absoluten Abstände zwischen zwei Fluorophoren beachtet werden [86]. Um die Anisotropie  $r$  zu messen, wird die zu untersuchende Probe mit linear polarisiertem Licht angeregt und die Fluoreszenzintensität polarisationsabhängig detektiert (s. Abbildung 2.4.2). Die Anisotropie berechnet sich folgendermaßen (s. Gleichung (5)):

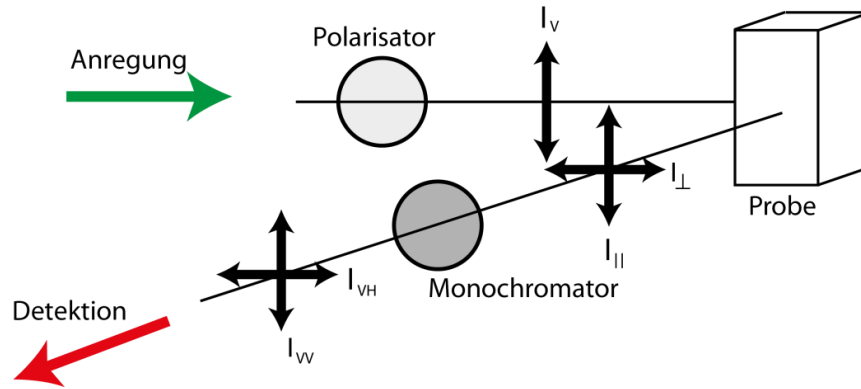
$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad (5)$$

wobei  $I_{VX}$  der senkrechten Anregungspolarisation mit entweder der senkrechten oder waagrechten Emissionspolarisation entspricht. Der G-Faktor berechnet sich zu (s. Gleichung (6)):

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad (6)$$

mit  $I_{HX}$  der parallelen Anregungspolarisation mit entweder der senkrechten oder waagrechten Emissionspolarisation.

Der G-Faktor ist ein Korrekturfaktor und ist von der Emissionswellenlänge und zu einem gewissen Grad vom Monochromator des Spektrometers abhängig [91]. Insgesamt müssen entsprechend vier individuelle Messungen für die Berechnung der Fluoreszenzanisotropie durchgeführt werden.



**Abbildung 2.4.2:** Schematischer Aufbau zur Messung der Fluoreszenzanisotropie (verändert nach [91]). Das Anregungslicht wird durch den Polarisator linear polarisiert und passiert den Probenraum, der die fluoreszierende Probe enthält. Die vertikale bzw. horizontale Polarisation des Emissionslichts kann mit Hilfe eines Monochromators detektiert werden.

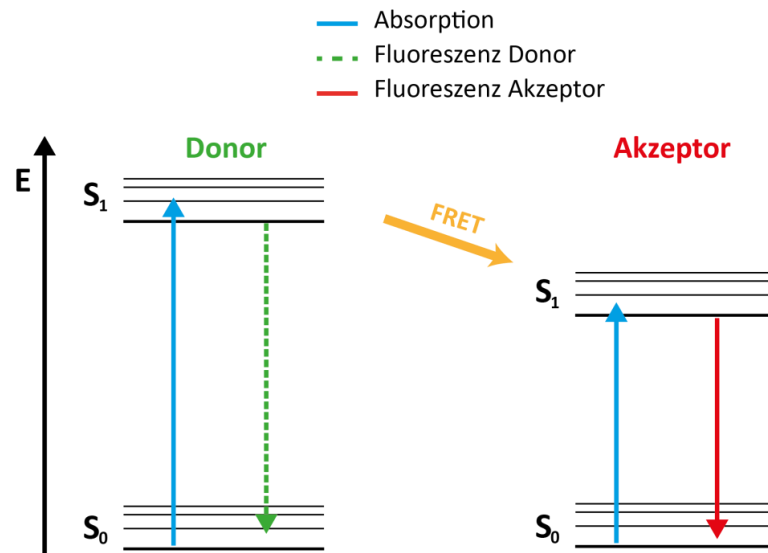
### 2.4.3 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)

Befinden sich zwei fluoreszierende Farbstoffmoleküle in unmittelbarer Nähe (2–10 nm), so kann über eine strahlungslose Dipol-Dipol-Wechselwirkung Energie von einem Molekül auf das andere Molekül übertragen werden. Dies wurde von Theodor Förster im Jahre 1948 theoretisch beschrieben [92]. Bei diesem Prozess wird ein Donor-Fluorophor in den  $S_1$ -Zustand angeregt. Statt der Relaxation des Donors in den Grundzustand durch Abgabe eines Photons, kann dieser seine Energie strahlungslos auf ein benachbartes Akzeptor-Fluorophor übertragen, sodass dieses ein Photon emittiert und der Donor das Photon nicht direkt emittiert [93] (s. Abbildung 2.4.3). Die Transferrate  $k_T(R)$ , die die Häufigkeit der Übergänge vom Donor auf den Akzeptor angibt, kann mit Hilfe Fermi's Goldener Regel berechnet werden (s. Gleichung (7)):

$$k_T(R) = \frac{9\Phi_D \ln(10) \kappa^2 J}{128\pi^5 \tau_D n^4 R^6 N_A} \quad (7)$$

mit  $\Phi_D$ , der Quantenausbeute des Donors in Abwesenheit des Akzeptors,  $\kappa^2$  den Orientierungsfaktor,  $J$  dem spektralen Überlappintegral zwischen Donoremission und Akzeptorabsorption,  $\tau_D$  der Lebensdauer des angeregten Zustands des Donors,  $R$  dem Abstand zwischen Donor und Akzeptor,  $n$  dem Brechungsindex des Mediums und  $N_A$  der Avogadro-Konstante.

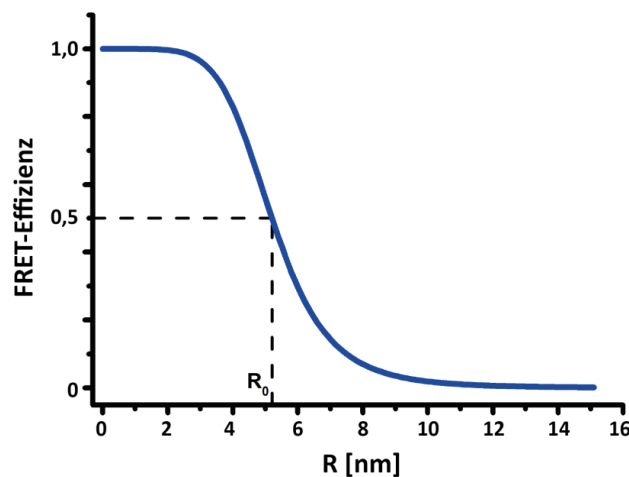




**Abbildung 2.4.3:** Vereinfachtes Termschema für FRET. Wird ein Molekül (Donor) infolge von Lichtabsorption angeregt ( $S_1$ -Zustand), so kann die Energie anstatt von Fluoreszenz strahlungslos an ein benachbartes Molekül (Akzeptor) übertragen werden, welches dann ein Photon aussenden kann.

Der Energieübertrag ist abhängig vom Abstand  $R$  zwischen den beiden Farbstoffmolekülen und kann durch folgende Gleichung (8) beschrieben werden:

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{R}{R_0}\right)^6} \quad (8)$$



**Abbildung 2.4.4:** Abhängigkeit der FRET-Effizienz vom Abstand des Donor-Akzeptor-Paares. Gezeigt ist die Abstandsabhängigkeit für das in der Arbeit verwendete Donor-Akzeptor-Paar DyLight 550 und DyLight 650 (Förster-Radius  $R_0=5,2$  nm).

Dabei ist  $E$  die Effizienz des Energietransfers,  $R$  der Abstand zwischen den Farbstoffmolekülen und  $R_0$  der Försterradius. Dieser entspricht dem Radius, bei dem die Transfer-Effizienz genau 0,5 beträgt und muss für jedes Fluoreszenzfarbstoff-Paar individuell

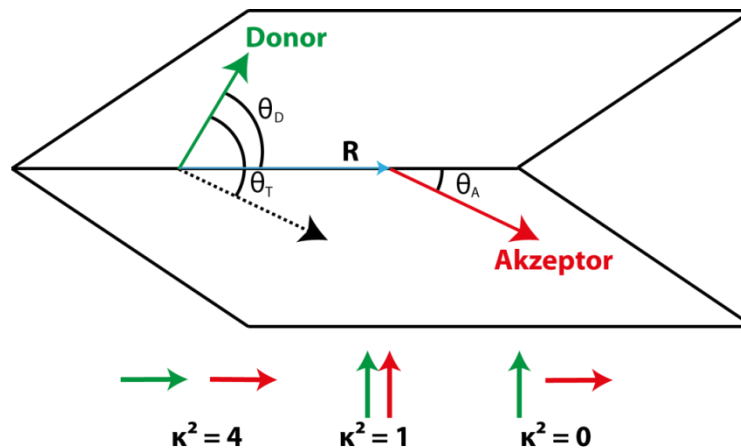
bestimmt werden. Da die FRET-Effizienz von der inversen sechsten Potenz des Abstandes abhängt, können Abstandsänderungen nur nahe des Förster-Radius' mit großer Genauigkeit gemessen werden, da dort das System sensitiv reagiert. An den Extrempunkten hingegen ändert sich die FRET-Effizienz bei großen Abstandsänderungen kaum (s. Abbildung 2.4.4).  $R_0$  in [nm] kann durch folgende Gleichung (9) ausgedrückt werden:

$$R_0 = \sqrt[6]{\frac{9\Phi_D \ln(10) \kappa^2 J}{128\pi^5 n^4 N_A}} \quad (9)$$

wobei  $\Phi_D$  die Quantenausbeute des Donors in Abwesenheit des Akzeptors,  $\kappa^2$  der Dipolorientierungsfaktor,  $J$  das spektrale Überlappintegral zwischen Donoremision und Akzeptorabsorption,  $n$  der Brechungsindex des Mediums und  $N_A$  die Avogadro-Konstante ist.  $\kappa^2$  beschreibt die relative Orientierung der Fluorophore zueinander und ist durch folgende Gleichung (10) definiert:

$$\kappa^2 = (\cos \theta_T - 3 \cos \theta_D \cos \theta_A)^2 \quad (10)$$

wobei  $\theta_T$  der Winkel zwischen dem Emissionsdipol des Donors und dem Absorptionsdipol des Akzeptors ist und  $\theta_D$  und  $\theta_A$  jeweils die Winkel zwischen beiden Dipolen und dem Verbindungsvektor  $R$  zwischen Donor und Akzeptor sind (s. Abbildung 2.4.5).



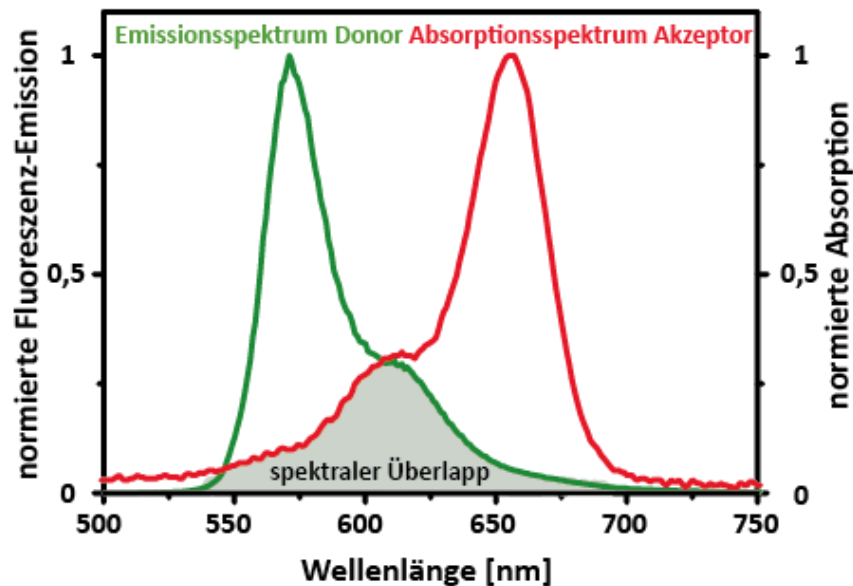
**Abbildung 2.4.5:** Schematische Darstellung der Abhängigkeit des Dipolorientierungsfaktors  $\kappa^2$  von der Orientierung zwischen dem Emissionsdipol des Donors (grün) und dem Absorptionsdipol des Akzeptors (rot).  $R$  ist der Abstand zwischen den beiden Dipolen. Liegen die beiden Dipole in einer Richtung kollinear, so ist  $\kappa^2=4$ . Für parallele Dipole ist  $\kappa^2=1$  und liegen die Dipole senkrecht zueinander, so nimmt  $\kappa^2$  den Wert 0 an (verändert nach [91]).

$\kappa^2$  kann theoretisch die Werte zwischen 0 und 4 annehmen, wobei sich für zwei frei rotierende Fluorophore ein Wert von  $2/3$  ergibt [94], wenn über alle möglichen Winkel

integriert wird [95]. Ein Energietransfer zwischen zwei Farbstoffen kann nur auftreten, wenn sich das Emissionsspektrum des Donors und das Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen (s. Abbildung 2.4.6). Dies wird durch das Überlappintegral  $J$  beschrieben und ist durch folgende Gleichung (11) gegeben:

$$J = \int f_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (11)$$

mit dem normierten Donoremissionsspektrum  $f_D(\lambda)$  und dem Extinktionskoeffizienten des Akzeptors  $\varepsilon_A(\lambda)$ . Je größer der spektrale Überlapp ist, desto effizienter ist der Energietransfer.



**Abbildung 2.4.6:** Graphische Darstellung des spektralen Überlapps (grau) zwischen dem Emissionsspektrum des Donorfluorophors DyLight 550 (grün) und dem Absorptionsspektrum des Akzeptorfluorophors DyLight 650 (rot).

Experimentell lässt sich die FRET-Effizienz aus dem Intensitätsverhältnis von Donor ( $I_D$ ) und Akzeptor ( $I_A$ ) bestimmen (s. Gleichung (12)) bzw. aus der Fluoreszenzlebensdauer des Donors in An ( $\tau_{DA}$ ) - und Abwesenheit ( $\tau_D$ ) des Akzeptors:

$$E = \frac{I_A}{I_D + I_A} = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad (12)$$

#### 2.4.4 Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie

Die interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (englisch: *total internal reflexion fluorescence*; TIRF) beruht auf der Entstehung eines evaneszenten Feldes bei der internen Totalreflexion. Totalreflexion entsteht, wenn das Anregungslicht unter einem bestimmten Winkel  $\alpha_c$  von einem Medium mit höherem Brechungsindex  $n_1$  zum Medium mit niedrigerem Brechungsindex  $n_2$  übergeht. Das Snelliussche Brechungsgesetz beschreibt die Abhängigkeit des Reflexions- und Brechungswinkels von einem einfallenden Lichtstrahl beim Übergang in ein anderes Medium (s. Gleichung (13)):

$$\frac{\sin \alpha_1}{\sin \alpha_2} = \frac{n_2}{n_1} \quad (13)$$

Wird  $\alpha_1$  größer als der kritische Winkel  $\alpha_c$ , so wird der einfallende Lichtstrahl beim Übertritt von einem optisch dichteren  $n_1$  zu einem optisch dünneren Medium  $n_2$  total reflektiert. Wird für  $\alpha_2=90^\circ$  eingesetzt und nach  $\alpha_1=\alpha_c$  aufgelöst, ergibt sich (s. Gleichung (14)):

$$\alpha_c = \arcsin\left(\frac{n_2}{n_1}\right) \quad (14)$$

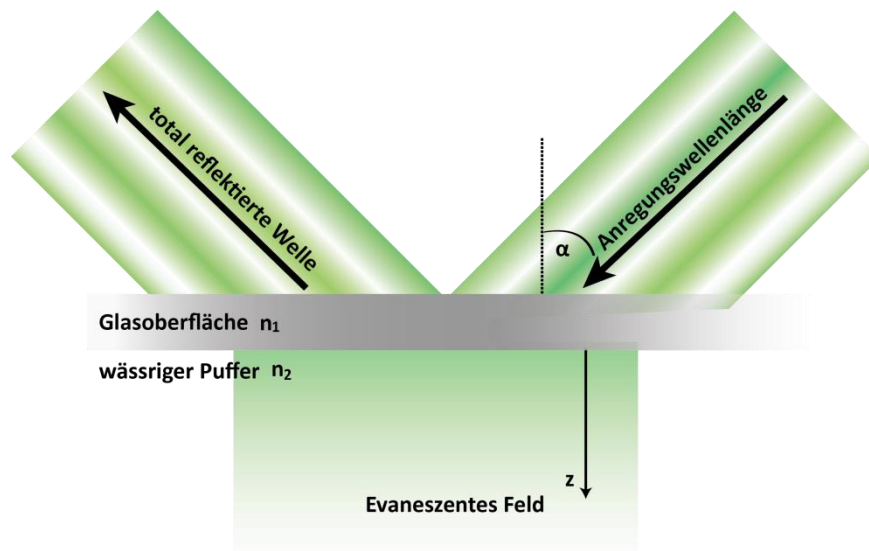
Wird für  $n_1 = 1,46$  (Brechungsindex des Deckglases aus Quarzglas) und für  $n_2 = 1,33 - 1,40$  (Brechungsindex eines wässrigen Puffers) eingesetzt, so ergibt sich daraus ein kritischer Winkel von ca.  $66^\circ$ . An der Grenzfläche dringt jedoch ein kleiner Teil der Lichtenergie als exponentiell abklingende evaneszente Welle in das optisch dünnere Medium mit einer Eindringtiefe von einigen hundert Nanometern ein (s. Abbildung 2.4.7). Die Intensitätsabnahme des evaneszenten Feldes kann durch folgende Gleichung (15) beschrieben werden:

$$E(z) = E_0 e^{-z/d} \quad (15)$$

mit  $E_0$  der Energie des einfallenden elektrischen Feldes und  $d$  der Eindringtiefe des evaneszenten Feldes. Die Eindringtiefe  $d$  ist abhängig vom Einfallswinkel des Anregungslichts  $\alpha$  sowie dessen Wellenlänge  $\lambda$  und den Brechungsindizes der Medien (s. Gleichung (16)):

$$d = \frac{\lambda_{\text{Anregung}}}{4\pi} \frac{1}{\sqrt{(n_1^2 \sin^2(\alpha) - n_2^2)}} \quad (16)$$

In der TIRF-Mikroskopie werden somit nur Moleküle, die sich an der Grenzfläche befinden (auf der Oberfläche des Quarzglas' immobilisiert sind) vom evaneszenten Feld angeregt, während die sich in Lösung befindenden Moleküle kaum angeregt werden und dies somit zu einem verbesserten Signal zu Rausch-Verhältnis führt.



**Abbildung 2.4.7:** An der Grenzfläche zwischen Glasoberfläche mit höherem Brechungsindex  $n_1$  und dem wässrigen Puffer mit dem niedrigeren Brechungsindex  $n_2$  bildet sich unter Totalreflexion  $\alpha$  ein evaneszentes Feld aus, das exponentiell abklingt.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Mikrobiologische Methoden

#### 3.1.1 Transformation

Zu jeweils 50  $\mu$ l kompetenten Zellen (*E. coli* BL21(DE3) Rosetta (Novagen), *E. coli* BL21(DE3) pAmbAz, *E. coli* BL21(DE3) pEvolv) wurden 500 ng Plasmid-DNA pipettiert und 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden anschließend einem Hitzeschock bei 42 °C für 40 s ausgesetzt. Nach Inkubation der Lösung für 2 - 3 min auf Eis, wurde der Lösung entweder zur Regeneration der Zellen 200  $\mu$ l SOC-Medium (New England Biolabs) zugefügt und bei 37 °C unter Schütteln (700 rpm, Thermomixer comfort, Eppendorf) eine Stunde inkubiert oder sofort auf eine LB-Agarplatte, die ein entsprechendes Antibiotikum als Selektionsmarker enthält, ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

#### 3.1.2 Rekombinante Proteinexpression

##### 3.1.2.1 Standardexpression

Es wurde eine Übernachtskultur, die aus 50 ml LB-Medium, Ampicillin (100  $\mu$ g/ ml) und einem Klon aus erfolgreicher Transformation (*E. coli* BL21(DE3) Rosetta) zusammengesetzt ist, angesetzt. 4 x 500 ml Vollmedium (Zusammensetzung s. Tabelle 3.1.1) wurde mit der Übernachtskultur auf eine  $OD_{600} = 0,1$  inokuliert.

Reagenz	Menge für 1 l
Trypton	20 g
Hefeextrakt	15 g
NaCl	8 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
Glyzerin	8 ml
MilliQ-Wasser	ad 1 l

**Tabelle 3.1.1:** Zusammensetzung des Vollmediums

Die Kulturen wurden bei 37 °C und 160 rpm geschüttelt (innova 42, Eppendorf) und bei  $OD_{600} = 0,6 - 0,8$  mit 1 mM IPTG induziert. Nach weiteren 3 - 4 Stunden wurden die Kul-

turen bei 5000 x g für 15 min zentrifugiert und die Zellpellets bei -20°C gelagert oder sofort weiterverarbeitet.

### 3.1.2.2 Expressionsbedingungen zum Einbau einer unnatürlichen Aminosäure in ein Zielprotein

Für die Expression von Proteinen, in welche die unnatürliche Aminosäure *p*-Azido-L-phenylalanin (Chem-Impex International, IL, USA) eingebaut werden sollte, wurden zwei Varianten eingesetzt: Expression im Minimal Medium (s. Tabelle 3.1.2, Tabelle 3.1.3 und Tabelle 3.1.4) und Expression im Vollmedium. Alle Komponenten des Minimal Mediums wurden entweder durch Filtrieren oder Autoklavieren sterilisiert. Für die Expression im Minimal Medium wurde eine Übernachtskultur aus 5 ml LB-Medium mit entweder 100 µg/ml Ampicillin und 50 µg/ml Chloramphenicol (bei Verwendung von *E. coli* BL21(DE3) pEvolv) oder 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Tetracyclin (bei Verwendung von *E. coli* BL21(DE3) pAmbAz) mit einer einzelnen Kolonie inokuliert und bei 37 °C bei 160 rpm über Nacht geschüttelt. Die Kultur wurde anschließend bei 4000 x g für 15 min zentrifugiert und das Pellet in 50 ml Minimal Medium mit den jeweiligen Antibiotika resuspendiert und über einen Tag und Nacht weitergeschüttelt. 500 ml Minimal Medium wurden mit der Suspension auf eine OD<sub>600</sub> = 0,1 inokuliert und für ca. 3 h bei 37 °C und 160 rpm kultiviert. Bei einer OD<sub>600</sub> = 0,3 - 0,4 wurden 100 mg *p*-Azido-L-phenylalanin dazugegeben und bei OD<sub>600</sub> = 0,6 - 0,8 mit 1 mM IPTG induziert. Anschließend wurden die Zellen für mindestens weitere 4 h kultiviert und bei 5000 x g für 15 min zentrifugiert. Die Bakterienpellets wurden entweder bei -20°C gelagert oder sofort weiterverarbeitet.

Reagenz	Menge für 500 ml
20 % Glukose (w/v) (sterilfiltriert)	10 ml
10 x M9 Salze (Sigma Aldrich) (autoklaviert)	50 ml
1 M Magnesiumsulfat (sterilfiltriert)	1 ml
1 M Kalziumchlorid (sterilfiltriert)	50 µl
1000 x Mikronährstoffe (s. Tabelle 3.1.3) (sterilfiltriert)	500 µl
1000 x Vitamine (s. Tabelle 3.1.4) (sterilfiltriert)	500 µl
100 mg/ml Ampicillin (sterilfiltriert)	500 µl
25 mg/ml Tetracyclin oder 50 mg/ml Chloramphenicol	500 µl
MilliQ-Wasser (autoklaviert)	440 ml

**Tabelle 3.1.2:** Zusammensetzung des Minimal Mediums

Endkonzentration im Medium	Reagenz	Menge für 50 ml
3 $\mu$ M	Ammonium Molybdat	50 $\mu$ l von 3 M
400 $\mu$ M	Borsäure	50 $\mu$ l von 400 mM
30 $\mu$ M	Cobaltchlorid	50 $\mu$ l von 30 mM
10 $\mu$ M	Kupfersulfat	50 $\mu$ l von 10 mM
80 $\mu$ M	Manganchlorid	50 $\mu$ l von 80 mM
20 $\mu$ M	Zinksulfat	50 $\mu$ l von 20 mM

**Tabelle 3.1.3:** Zusammensetzung der Mikronährstoffe mit einer 1000 x Konzentration

Reagenz	Menge für 1 l
Cholinchlorid	0,4 g
Folsäure	0,5 g
Nikotinamid	0,5 g
Myo-Inositol	1 g
Pyridoxal HCl	1 g
Thiamin HCl	2 g
Riboflavin	0,05 g
Biotin	1 g

**Tabelle 3.1.4:** Zusammensetzung der Vitamine mit einer 1000 x Konzentration

Für die Expression im Vollmedium wurden 50 ml Übernachtskultur mit den entsprechenden Antibiotika versetzt und mit einer Bakterienkolonie inokuliert. Nach Zentrifugation bei 4000 x g für 15 min und Resuspendieren des Pellets in Vollmedium mit den entsprechenden Antibiotika, wurde eine 500 ml Expressionskultur angelegt, die eine  $OD_{600} = 0,1$  besitzt. Bei  $OD_{600} = 0,3 - 0,4$  wurden 100 mg *p*-Azido-L-phenylalanin und 0,02 % (w/v) Arabinose hinzugefügt. Die darauffolgenden Schritte sind analog zur Variante mit Minimal Medium durchgeführt worden.

## 3.2 Proteinbiochemische Methoden

### 3.2.1 Aufschluss und Reinigung von löslichen Proteinen

#### 3.2.1.1 RNA Polymerase Untereinheiten und TBP

Die Zellpellets wurden in jeweils 7 ml Puffer  $P_{300}/\beta$ -Mercaptoethanol (200 mM Tris/Acetat pH 7,9; 100 mM MgAc; 0,1 mM  $ZnSO_4$ ; 300 mM KAc; 10 % Glycerin; 0,05%  $\beta$ -Mercaptoethanol) pro 500 ml Kultur resuspendiert und anschließend mit einer Sonotrode (SonoPuls, Bandelin) für 5 x 1 min bei Stärke 80% und Cycle 5 x 10% auf Eis soni-



fiziert. Durch Kavitation wurden so die Zellwände der Zellen aufgebrochen. Die darauf folgende Zentrifugation bei 15000 x g für 30 min trennte die löslichen von den unlöslichen Komponenten. Die RNAP Untereinheiten Rpo3, Rpo5, Rpo4/7, Rpo10, Rpo3/11, Rpo12 und der Transkriptionsfaktor TBP lagen nach der Zentrifugation in Lösung vor. Es wurden zu jeder Proteinlösung jeweils 5 µl DNase (2 U/µl, Ambion) und 5 µl RNase (20 - 40 mg/ml, Sigma Aldrich) zugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken inkubiert. So wurde die genomische DNA und RNA der *E. coli* Bakterien nukleolytisch abgebaut. Die Trennung der archaeellen von den bakteriellen Proteinen erfolgte durch Erhitzen der Lösung auf 65 °C für 20 min und anschließender Zentrifugation bei 15000 x g für 30 min. Die bakteriellen Proteine denaturieren bei dieser Temperatur, während die hitzestabilen archaeellen Proteine im Überstand verbleiben. Zur weiteren Reinigung wurden die Proteine durch Zugabe von Ammoniumsulfat, bis Sättigung erreicht wurde, gefällt und durch Zentrifugation (30 min, 15000 x g, 4°C) von der Lösung getrennt, sodass im Pellet das Protein enthalten ist. Dieses Pellet wurde in 4 ml P<sub>300</sub>/β-Mercaptoethanol resuspendiert und anschließend mit Hilfe einer Gel-filtrationssäule (HiPrep-Sephacryl, S-100 16/60, GE Healthcare) mit P<sub>300</sub>/β-Mercaptoethanol als Laufpuffer weiter gereinigt. Die Fraktionen, die das entsprechende Protein enthielten, wurden mittels eines Konzentrators (Amicon Ultra-15, MWCO:3000 Da, Merck Millipore) konzentriert.

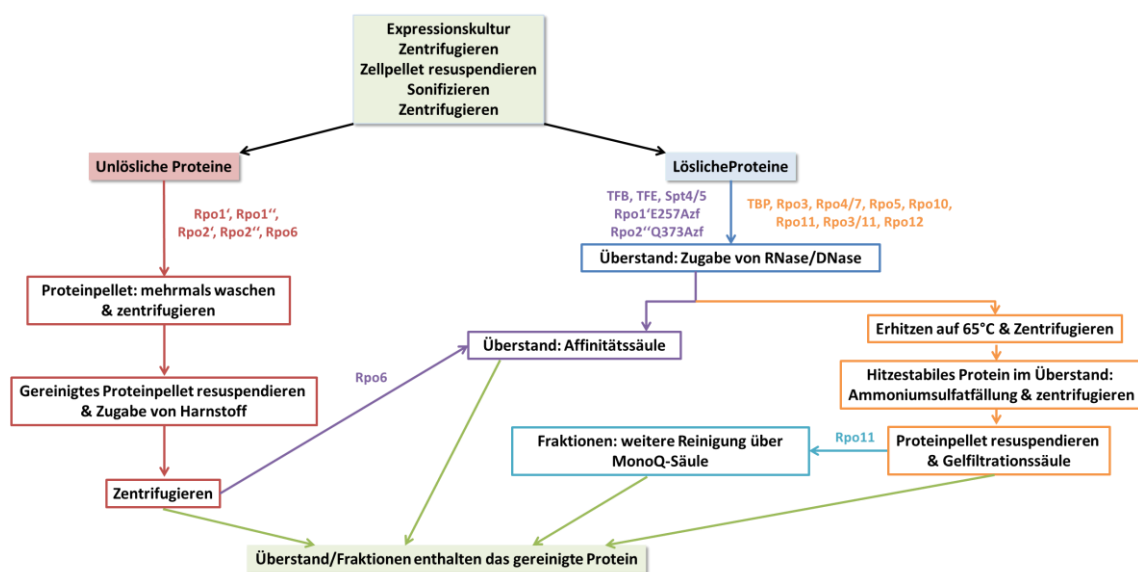
#### 3.2.1.2 RNAP Untereinheit Rpo11

Das Reinigungsprotokoll gestaltet sich analog wie in Kapitel 3.2.1.1. Die Fraktionen beim Gelfiltrationslauf mit dem gewünschten Protein wurden allerdings nicht, wie in Kapitel 3.2.1.1 beschrieben, konzentriert, sondern einem weiteren Reinigungsschritt unterzogen, um das β-Mercaptoethanol aus dem Puffer zu entfernen, sodass keine konkurrierenden Thiole für die spätere Markierung des Proteins vorhanden sind (s. Kapitel 3.2.7). Die Fraktionen von Rpo11 wurden mit 50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 50 mM NaCl verdünnt und anschließend auf die Ionenaustauschersäule (MonoQ 4.6/100 PE, GE Healthcare) geladen. Das Protein Rpo11 wurde mit 50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 1 M NaCl über einen Gradienten von zehn Säulenvolumina eluiert.

### 3.2.2 Aufschluss und Reinigung unlöslicher RNA Polymerase Untereinheiten

Die Zellpellets wurden in jeweils 7 ml 1 x PBS pro 500 ml Kultur resuspendiert, anschließend wie in 3.2.1.1 sonifiziert und bei 15000 x g für 30 min zentrifugiert. Da die

vier katalytischen Untereinheiten der RNA Polymerase (Rpo1', Rpo1'', Rpo2', Rpo2'') in Einschlusskörperchen (englisch: *inclusion bodies*) aggregieren, wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 3-4 Waschschritten (1 x PBS; 1% Triton; 1 mM EDTA; pH 7,4) und Zentrifugationsschritten (15000 x g, 30 min, 4°C) gereinigt. Um das Triton zu entfernen, wurden nochmal zwei Waschschriffe (1 x PBS; 1 mM EDTA) und Zentrifugationsschritte (15000 x g, 30 min, 4°C) durchgeführt. Weiterhin wurde, um die Proteine zu solubilisieren, Harnstoff in sättigender Menge hinzugegeben und zentrifugiert (15000 x g, 30 min, 15°C), sodass nun der Überstand das gewünschte und gereinigte Protein enthielt. Die Abbildung 3.2.1 zeigt ein Flussschema für die Reinigung der einzelnen Proteine.



**Abbildung 3.2.1:** Flussschema für die Reinigung der Transkriptionsfaktoren und einzelnen Untereinheiten der RNA Polymerase

### 3.2.3 Aufschluss und Reinigung mittels Affinitätschromatographie

#### 3.2.3.1 HisTrap-Reinigung

Die katalytischen RNA Polymerase Untereinheiten Rpo1'<sup>E257Azf</sup> und Rpo2''<sup>Q373Azf</sup> sowie die Untereinheit Rpo6 und die Transkriptionsfaktoren TFB und TFE besitzen ein 6 x Histidin-Tag am C-Terminus, sodass eine Reinigung über die Nickel-Nitrilo-Tri-Acetat-Säule (Ni-NTA) nach Zellaufschluss möglich ist. Die Zellpellets von Rpo1'<sup>E257Amb</sup>, Rpo2''<sup>Q373Amb</sup> und TFE wurden in jeweils 7 ml 50 mM Tris/ HCl pH 7,5; 250 mM NaCl; 6 M Urea; 20 mM Imidazol pro 500 ml Kultur resuspendiert. Anschließend wurde Harnstoff hinzugefügt, bis eine Sättigung erreicht wurde, um die Einschlusskörperchen aufzubrechen. Das Zellpellet von TFB wt wurde in N<sub>500</sub>; 0,5% Triton;

20 mM Imidazol gelöst (s. Tabelle 3.2.1). Anschließend wurde jede Lösung, wie in 3.2.1.1 beschrieben, sonifiziert und zentrifugiert. Die jeweiligen Zellsuspensionen wurden auf eine Ni-NTA-Säule (HisTrap 1 ml FF, GE Healthcare) mit dem Puffer, der 20 mM Imidazol enthielt, geladen. Die Proteine Rpo1<sup>E257Azf</sup>, Rpo2<sup>Q373Azf</sup> und TFB wurden mit dem jeweils dazugehörigen Puffer, der 250 mM Imidazol enthielt, über einen Gradienten von 8 Säulenvolumina eluiert. Das Zellpellet von Rpo6 wurde zunächst, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, behandelt und mit dem Puffer P<sub>300</sub>; 6 M Harnstoff; 20 mM Imidazol auf die Ni-NTA-Säule geladen und anschließend mit dem Puffer P<sub>300</sub>; 6 M Harnstoff; 250 mM Imidazol über einen Gradienten von 8 Säulenvolumina eluiert. Das Zellpellet von TFE wurde in dem Puffer 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 6 M Harnstoff resuspendiert und nach Hinzufügen von Harnstoff in sättigender Menge, sonifiziert und zentrifugiert (15000 x g, 30 min, 15 °C). Da TFE zunächst denaturiert vorlag, wurde TFE auf der Ni-NTA-Säule langsam zurückgefaltet, indem ein Pufferwechsel (50 mM Tris/HCl pH 7,5; 250 mM NaCl; 30% Glycerin; 20 mM Imidazol) über einen Gradienten von 30 Säulenvolumina vorgenommen wurde. Anschließend wurde TFE mit dem Elutionspuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 30% Glycerin, 250 mM Imidazol) manuell eluiert.

<b>Puffer N<sub>500</sub></b>
200 mM Tris/Acetat pH7,9
100 mM MgAc
0,1 mM ZnSO <sub>4</sub>
500 mM NaCl
10 % Glycerin

**Tabelle 3.2.1:** Zusammensetzung des Puffers N<sub>500</sub>

### 3.2.3.2 GST Trap Reinigung

Die Zellpellets der Bakterienzellen, die den Elongationsfaktors Spt4/5 koexprimiert hatten, wurden in jeweils 7 ml P<sub>300</sub>/β-Mercaptoethanol pro 500 ml Kultur resuspendiert und wie im Kapitel 3.2.1.1 beschrieben sonifiziert und bei 15000 x g für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem Puffer P<sub>100</sub>/β-Mercaptoethanol (200 mM Tris/Acetate pH 7,9; 100 mM MgAc; 0,1 mM ZnSO<sub>4</sub>; 100 mM KAc; 10 % Glycerin; 0,05% β-Mercaptoethanol) auf eine GST-Säule (GSTrap FF 1 ml, GE Healthcare) geladen und mit dem Puffer P<sub>100</sub>; 5 mM DTT; 10 mM Glutathion über einen Gradienten von 10 Säulenvolumina eluiert. Die Fraktionen, die das gewünschte Protein enthielten, wurden gesammelt und mit 10 µl Thrombin (1 U/µl) bei 4°C über Nacht inkubiert. Dabei wurde

der GST-Tag vom Protein getrennt und anschließende Hitzeinaktivierung bei 65 °C für 20 min und Zentrifugation bei 15000 x g für 30 min führte zur Abtrennung des denaturierten Thrombins und des GST-Tags. Mit Hilfe eines Filters (Amicon Ultra-15, MWCO:3000, Merck Millipore) wurde das Protein konzentriert.

### 3.2.4 Konzentrationsbestimmung

#### 3.2.4.1 Bradford

Bei der Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford wurden 190 µl Bradford-Reagenz (Sigma Aldrich) mit 10 µl Proteinlösung vermischt und die Absorption bei 595 nm gemessen. Als Referenz wurden 190 µl Bradford-Reagenz und 10 µl Puffer (in dem das jeweilige Protein gelöst ist) verwendet. Mittels einer Kalibriergeraden (Steigungswert: 0,41, s. Abbildung 3.2.2), die mit BSA-Konzentrationen im Bereich 0,1 - 2,5 mg/ml hergestellt wurden, konnte die Proteinkonzentration bestimmt werden.

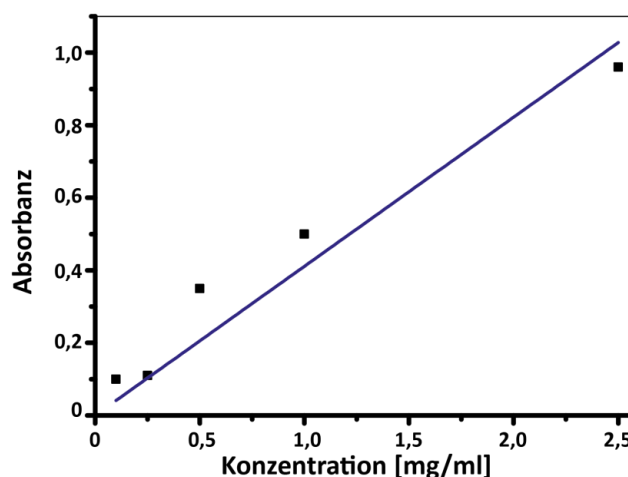


Abbildung 3.2.2: BSA-Kalibriergerade

#### 3.2.4.2 Extinktionskoeffizient

Zur Bestimmung des Proteingehaltes über den Extinktionskoeffizienten sowie zur Bestimmung der Farbstoffkonzentration im Protein wurden UV-Vis Absorptionsspektren mit einem Absorptionsspektrometer (NanoDrop, Thermo Scientific) aufgenommen und mit Hilfe der jeweiligen Extinktionskoeffizienten der Proteine bzw. Fluorophore die Konzentration mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes (17) bestimmt:

$$c = \frac{A}{\varepsilon \cdot d} \quad (17)$$

mit  $c$  der Konzentration,  $A$  der Absorbanz,  $d$  der Weglänge und  $\epsilon$  dem Extinktionskoeffizienten (s. Tabelle 4.1.1, Tabelle 4.2.1). Die Absorbanz des Proteins wurde bei der Wellenlänge 280 nm und die Absorbanz der Fluorophore DyLight 550 bei 550 nm und DyLight 650 bei 650 nm bestimmt.

#### 3.2.4.3 Ellmann's Test

Die reduzierten Cysteine in einem Protein wurden bestimmt, indem 30  $\mu$ l Proteinlösung mit 1  $\mu$ l 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzonate) (DTNB, 20 mM in 0,1 M  $KPO_4$ , pH 7,4) vermischt und die Absorption mit dem Absorptionsspektrometer (NanoDrop, Thermo Scientific) bei 412 nm gemessen wurde. Als Referenz diente 30  $\mu$ l Proteinpuffer mit 1  $\mu$ l DTNB. Da das Verhältnis bei der Reaktion zwischen den Thiolen im Protein und dem DTNB 1:1 beträgt, kann so die freie Cysteinkonzentration gemessen werden. Der Extinktionskoeffizient von DTNB beträgt  $\epsilon = 14150 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

#### 3.2.5 SDS-PAGE

Bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Tris/Glycin-PAGE) wurden Proteine nach ihrem Molekulargewicht in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Zunächst wurden die Disulfidbrücken in Proteinen durch Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol zu freien Thiolen reduziert und das Protein durch Erhitzen auf 95 °C für 5 min denaturiert. Die Zugabe von SDS führte weiterhin zur Denaturierung der Tertiärstruktur und verlieh dem Protein eine negative Ladung, die proportional zur seiner Masse ist. Somit ist nach Anlegen eines elektrischen Feldes die Wanderungsstrecke der Proteine umgekehrt proportional zu ihrer Größe und ihr Molekulargewicht konnte mit Hilfe eines Größenstandards abgeschätzt werden. Das SDS-Gel ist aus einem Trenn- und einem Sammelgel zusammengesetzt. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 3.2.2 zusammengefasst. Mit den angegebenen Volumina konnten jeweils SDS-Gele unterschiedlicher Stärke hergestellt werden. Nach Einsetzen des Gels in eine Elektrophoresekammer (Biorad), die mit 1 x Laemmli-Laufpuffer (s. Tabelle 3.2.3) gefüllt war, wurde jeweils 10  $\mu$ l Probe, die sich aus 10  $\mu$ l Proteinprobe und 20  $\mu$ l Auftragspuffer (s. Tabelle 3.2.3) zusammensetzte, in die Taschen pipettiert. Das Gel lief bei einer angelegten Spannung von 200 V für 50 - 60 min und wurde anschließend mit der Coomassiefärbelösung (50% Methanol, 10% Essigsäure, 0,25% Brilliant Blue R (Sigma Aldrich)) unter leichtem Schwenken für 30 min gefärbt. Die Entfärbung erfolgte mit 40% Methanol und 10% Essigsäure. Das SDS-Gel wurde anschließend in einem Gelrocknungsrahmen (MINI-

Geltrocknungsrahmen, Roth) zwischen zwei Cellophan-Papieren über Nacht getrocknet.

Reagenz	Trenngel 10%	Trenngel 12%	Trenngel 15%	Trenngel 16%	Sammelgel 5%
MilliQ-Wasser	1,93 ml	1,6 ml	1,1 ml	0,9 ml	2,1 ml
30 % Polyacrylamid	1,67 ml	2 ml	2,5 ml	2,7 ml	0,5 ml
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml	-
1 M Tris/HCl pH 6,8	-	-	-	-	0,38ml
10 % SDS	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	30 µl
10 % APS	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	30 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	3 µl

Tabelle 3.2.2: Zusammensetzung der SDS-Gele

Puffer	Zusammensetzung
10xLaemmli-Laufpuffer	30 g/l Tris 144 g/l Glycin 10 g/l SDS
2xAuftragspuffer	0,125 M Tris/HCl, pH 6,8 20% (v/v) Glyzerin 4% (w/w) SDS 4% (v/v) β-Mercaptoethanol 0,02% (w/w) Bromphenolblau

Tabelle 3.2.3: Zusammensetzung des Lauf- und Auftragspuffers

### 3.2.6 Gelverzögerungsexperimente (Electrophoretic Mobility Shift Assay)

Die Grundlage eines Gelverzögerungsexperiment (*electrophoretic mobility shift assays* (EMSA)) basierte auf einer nativen PAGE. Bei der nativen PAGE wurden die Proteine nicht denaturiert, sondern in ihrer ursprünglich gefalteten und aktiven Form verwendet. Die Zusammensetzung der Gele ist wie in Kapitel 3.2.5 beschrieben, jedoch wurde das SDS durch MilliQ-Wasser ersetzt und der Laufpuffer sowie der Auftragspuffer enthielten kein SDS bzw. β-Mercaptoethanol.

Mit Hilfe des EMSAs wurde die Rekrutierung der fluoreszenzmarkierten RNAPs durch die Transkriptionsfaktoren auf die markierte Promoter-DNA (Sequenzen: s. Kapitel 3.3) untersucht. Der Ansatz bestand aus 0,13 µM markierter Promoter-DNA<sup>Alexa488</sup>, 5 µM

TBP, 5  $\mu$ M TFB, 0,1  $\mu$ M fluoreszenzmarkierter RNAP, 6,7 mM DTT, 0,07 mg/ml BSA in 1 x HMNE Puffer (40 mM Hepes, pH 7,3; 250 mM Natriumchlorid; 2,5 mM Magnesiumchlorid; 0,1 mM EDTA und 5% Glyzerin), welcher für 15 min bei 65°C inkubiert wurde. Daraufgehend wurden 0,8 mg/ml Heparin zugesetzt und für weitere 10 min bei 65°C inkubiert, um die unspezifische Bindung der RNAP an die DNA zu verringern. Nach Einsetzen des 12%-Gels in die Elektrophoresekammer, die mit 1 x nativem Laemmli-Laufpuffer gefüllt war, wurde jeweils 10  $\mu$ l Probe, die sich aus 10  $\mu$ l Proteinprobe und 20  $\mu$ l nativem Auftragspuffer zusammensetzte (s. Tabelle 3.2.4), in die Taschen pipetiert. Nach der Elektrophorese bei 200 V für 50 - 60 min erfolgte anschließend die Detektion der fluoreszierenden DNA-Banden am Fluoreszenzscanner (Typhoon FLA 7000, GE Healthcare) bei entsprechender Wellenlänge.

Puffer	Zusammensetzung
<b>10x Nativer Laemmli-Laufpuffer</b>	30 g/l Tris 144 g/l Glycin
<b>2x Nativer Auftragspuffer</b>	0,125 M Tris/HCl, pH 6,8 20% (v/v) Glyzerin 0,02% (w/w) Bromphenolblau

**Tabelle 3.2.4:** Zusammensetzung des nativen Lauf- und Auftragspuffers

### 3.2.7 Markierung von Proteinen

Zur Untereinheit Rpo11<sup>C88</sup>, die ein einzelnes Cystein enthält, wurde ein 10-facher molarer Überschuss an Maleimid modifiziertem Biotin (EZ-Link Maleimide-PEG<sub>2</sub>-Biotin, Thermo Scientific, gelöst in 1 x PBS) zugefügt und für 16 h bei 4°C inkubiert. Zu den Untereinheiten Rpo1<sup>E257Azf</sup> und Rpo2<sup>Q373Azf</sup> wurden die Phosphan-Derivate DyLight 550 und DyLight 650, die jeweils in DMSO gelöst wurden (Thermo Scientific), ebenfalls in einem 10-fachen molaren Überschuss zugegeben und unter Lichtabschluss entweder bei Raumtemperatur für 2 h oder bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Reaktion wurde in beiden Fällen durch Zugabe von 0,5%  $\beta$ -Mercaptoethanol gestoppt. Die erfolgreiche Reaktion konnte auf einem SDS-Gel und anschließendem Fluoreszenzscan überprüft werden.

### 3.2.8 Assemblierung der RNA Polymerase

Die RNA Polymerase aus dem Organismus *Methanocaldococcus jannaschii*, die sich aus zwölf individuellen Untereinheiten zusammensetzt, kann *in vitro* aus diesen as-

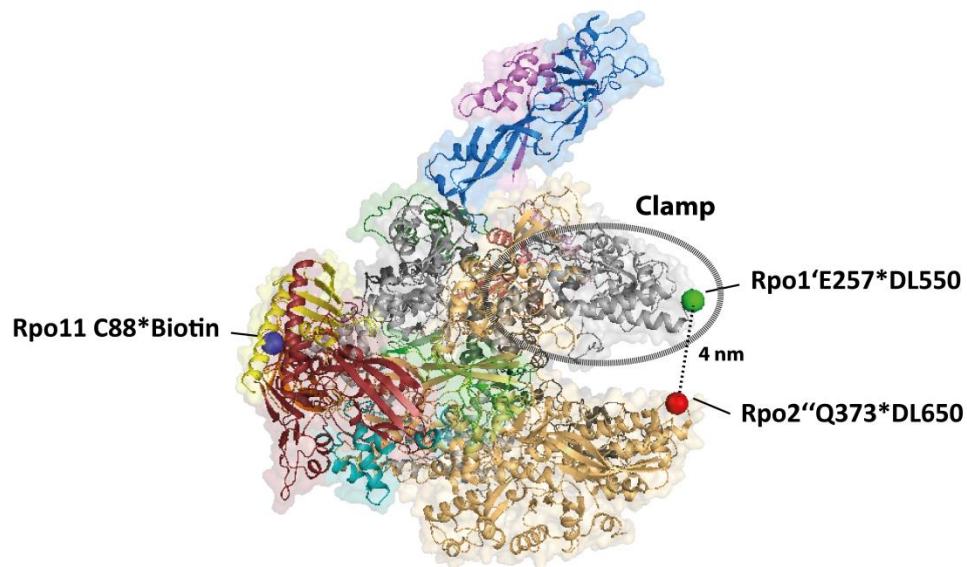
sembliert werden [30]. Dazu wurden die vier katalytischen Untereinheiten Rpo1', Rpo1'', Rpo2' und Rpo2'' in gleichem molaren Konzentrationsverhältnis und die kleineren Untereinheiten Rpo3/11, Rpo5, Rpo6, Rpo10 und Rpo12, relativ zu den großen Untereinheiten, im 5-fachen Überschuss vermischt. Um eine vollständige Denaturierung aller Proteine zu gewährleisten, wurde kristalliner Harnstoff zugefügt und gelöst, bis eine Sättigung erreicht wurde. Die Harnstoffkonzentration wurde während einer Dialyse (Slide-A-Lyzer G2 Dialysis Cassette, 3,5 ml, 3500 MWCO, Thermo Scientific) mit dem Startpuffer P<sub>100</sub>; 6 M Harnstoff schrittweise mit dem Puffer P<sub>100</sub>/  $\beta$ -Mercaptoethanol alle 20 min verringert (s. Tabelle 3.2.5), bis der Harnstoff vollständig entfernt war. Die native Faltung und aktive Form der RNAP wurde dadurch schrittweise wiederhergestellt. Das anschließende Erhitzen auf 65 °C für 20 min und Zentrifugation (15000 x g, 20 min, 4°C) trennte einzelne unlösliche Untereinheiten und zum Teil unvollständig assemblierte RNAPs von den vollständig gefalteten RNAPs.

c [Harnstoff]	P <sub>100</sub> / 6M Harnstoff	P <sub>100</sub> / $\beta$ -Mercaptoethanol
6 M	500 ml	-
4 M	333 ml	167 ml
3 M	377 ml	123 ml
2 M	333 ml	167 ml
1 M	250 ml	250 ml
0.5 M	250 ml	250 ml
0 M	-	500 ml

**Tabelle 3.2.5:** Dialysevorschrift

Eine zusätzliche Reinigung der vollständig assemblierten RNAP erfolgte durch die Gel-filtration (Superose 6, GE Healthcare) mit P<sub>100</sub>/  $\beta$ -Mercaptoethanol als Laufpuffer. Die Fraktionen mit der vollständig gefalteten RNAP wurden vereinigt und konzentriert (Amicon Ultra-15, MWCO:3000 Da, Merck Millipore). Um eine Wildtyp-RNAP (RNAP wt) mit ihren 12 Untereinheiten zu erhalten, wurden die fehlenden Untereinheiten Rpo4/7 nachträglich dazu pipettiert und auf 65 °C für 10 min erhitzt. Für die Einzelmolekülfluoreszenzmessungen wurden die mit den Farbstoffen DyLight 550 und DyLight 650 modifizierten Untereinheiten Rpo1<sup>E257Azf</sup> und Rpo2<sup>Q373Azf</sup> sowie die mit Biotin modifizierte Untereinheit Rpo11<sup>C88</sup> verwendet (s. Abbildung 3.2.3). Die Konzentration dieser RNAPs erfolgte mit dem Filter Centrisart 1 (MWCO: 100000 Da, Sartorius stedim biotech).





**Abbildung 3.2.3:** Kristallstruktur der RNA Polymerase aus *Sulfolobus shibatae* (PDB: 2WAQ) mit den drei Modifikationen an den Untereinheiten Rpo11<sup>C88</sup>, Rpo1'<sup>E257</sup> und Rpo2''<sup>Q373</sup>. Über das Biotin wurde die RNAP auf die Oberfläche immobilisiert. Die Bewegung der RNAP Clamp konnte durch das Auslesen der FRET-Änderung zwischen den beiden Fluorophoren DyLight 550 und DyLight 650 verfolgt werden.

### 3.3 Synthetische Oligonukleotide

Es wurden verschiedene künstliche DNA Konstrukte verwendet, um die unterschiedlichen Stufen des Transkriptionszyklus nachzubilden. Alle Oligonukleotide wurden bei IBA (Göttingen, Deutschland), MWG (Ebersberg, Deutschland) oder Sigma-Aldrich (München, Deutschland) käuflich erworben.

Für die EMSAs wurden zwei Oligonukleotide (pol592<sup>A488</sup>, pol600, s. Tabelle 3.3.1) in einem 1:1 molarem Verhältnis vermischt und anschließend hybridisiert, indem für 6 s auf 95 °C hochgeheizt und über einen Zeitraum von ca. 1,5 h auf 5 °C abgekühlt wurde. Die doppelsträngige DNA für den Prä-Initiationskomplex, die für die Einzelmolekülmessungen verwendet wurden, besteht aus 110 Basen und enthält den T6 Genpromoter aus dem *sulfolobus spindle-shaped virus* (SSV) [96].

Um den geschlossenen Prä-Initiationskomplex (PIK) nachzubilden, wurde eine vollständig komplementäre Promoter-DNA verwendet. Die Promoter-DNA für den offenen PIK besitzt eine DNA-Fehlpaarung von 4 Basenpaaren um den Transkriptionsstartpunkt (-3 bis +1, rot markiert in Tabelle 3.3.1), da gezeigt wurde, dass damit stabile PIKs, in der die DNA im offenen Komplex vorliegt, erreicht werden können [36]. Für die Immobilisierung für die Einzelmolekül-FRET-Messungen enthält der kodogene Strang am 3'-Ende ein Biotin. Der kodogene Strang und der nicht-kodogene Strang

wurden in einem 1:1 molaren Verhältnis hybridisiert, indem für 6 s auf 95 °C hochgeheizt und über einen Zeitraum von ca. 1,5 h auf 5 °C abgekühlt wurde.

Name	Sequenz 5' - 3'	Modifikation
pol592 <sup>A488</sup>	GATTGATAGAGTAAAGTTTAAATACTTATATAGATAGAG-TATAG <del>AT</del> AGAGGGTTCAAAAAZGGTT	Alexa488 (Z)
pol600	AACCATTTTTTTGAACCCCTC <del>CGCT</del> TATACTCTATCTATATAAG-TATTTAACTTTACTCTATCAATC	
nkS <sub>Initiation_Homoduplex</sub>	GATTGATAGAGTAAAGTTTAAATACTTATATAGATAGAG-TATAAGCGGAGGGTTGAGATGATGGTTAGGGTTGAGATGATGGTTATGGTTCATCTCGCAGCCACTCCGCA	
kS <sub>Initiation_Homoduplex</sub>	TGCGGAGTGGCTGCGAGATGAACCATAACCATCATCTCA-ACCCTAACCATCATCTCAACCCTCCGCTTATACTCTATCTA-TATAAGTATTTAACTTTACTCTATCAATC	Biotin 3'
nkS <sub>Initiation_Heteroduplex</sub>	GATTGATAGAGTAAAGTTTAAATACTTATAGAGATAGAG-TATAG <del>AT</del> AGAGGGTTGAGATGATGGTTAGGGTTGAGATGATGGTTATGGTTCATCTCGCAGCCACTCCGCA	
kS <sub>Initiation_Heteroduplex</sub>	TGCGGAGTGGCTGCGAGATGAACCATAACCATCATCTCA-ACCCTAACCATCATCTCAACCCTC <del>CGCT</del> -TATACTCTATCTCTATAAGTATTTAACTTTACTCTATCAATC	Biotin 3'
nkS <sub>Elongation</sub>	CCGGCAGTACTAGTAATGACCAGGCGTAACTACTTCA-TCTTAACTACTCTAATGGATCTCCCATATGGTGGAGG-TAAGGGTGG	Biotin 3'
kS <sub>Elongation</sub>	CCACCCTTACCTCCACCATATGGGAGATCCATTAGAG-TAGTTAAGATGAAGTAGTTACGCCTGGTCATTACTAG-TACTGCCGG	
kS <sub>Elongation</sub> (Biotin)	CCACCCTTACCTCCACCATATGGGAGATCCATTAGAG-TAGTTAAGATGAAGTAGTTA CGCCTGGTCATTACTAG-TACTGCCGG	Biotin 5'
RNA (T40)	AUUUAGACCAGGCG	
RNA (T43)	UUUACACCAGGCGU	
RNA (lang)	AACAUUACACGAUAUAUAUGAUUUAGACCAGGCG	

**Tabelle 3.3.1:** Verwendete Oligonukleotide. Die rot markierten Basen geben die DNA-Fehlpaarung um den Transkriptionsstartpunkt an.

Das Konstrukt für den Elongationsschritt wurde aus DNA- und RNA-Oligomeren gebildet, wobei der kodogene Strang und der nicht-kodogene Strang, bestehend aus jeweils 83 Basen, mit einer zum kodogenen Strang teilweise komplementären RNA hybridisiert wurde. Je nach Experiment wurde eine Länge von 14 oder 35 Basen für die RNA gewählt. Der kodogene Strang und die RNA wurden in einem molaren Verhältnis 1:8

hybridisiert (Endkonzentrationen: 25  $\mu\text{M}$  : 200  $\mu\text{M}$ ), indem für 6 s auf 95 °C hochgeheizt und über einen Zeitraum von ca. 1,5 h auf 5 °C abgekühlt wurde. Der nicht-kodogene Strang wurde erst bei der Präparation des Elongationskomplexes hinzugefügt (s. Kapitel 3.4). Je nach Experiment wurde entweder der nicht-kodogene Strang mit 3'-Biotin oder der kodogene Strang mit 5'-Biotin verwendet. Die Basenpaarung zwischen dem kodogenen Strang und den unterschiedlichen RNAs betrug immer 9 Basenpaare. Hybridisierte Konstrukte wurden anschließend bei -20°C gelagert. In Tabelle 3.3.1 sind die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide zusammengefasst.

### 3.4 Präparation der Transkriptionskomplexe

Für die Herstellung des Prä-Initiationskomplexes wurden 0,13  $\mu\text{M}$  Promoter-DNA (pol592<sup>A488</sup>/pol600; nkS<sub>Initiation\_Homoduplex</sub>/kS<sub>Initiation\_Homoduplex</sub>; nkS<sub>Initiation\_Heteroduplex</sub>/kS<sub>Initiation\_Heteroduplex</sub>), 8,7  $\mu\text{M}$  TBP, 13  $\mu\text{M}$  TFB, 0,1  $\mu\text{M}$  fluoreszenzmarkierte RNAP, 6,7 mM DTT, 0,07 mg/ml BSA in 1 x TMNE Puffer (40 mM Tris/HCl, pH 7,3; 250 mM Natriumchlorid; 2,5 mM Magnesiumchlorid; 0,1 mM EDTA und 5 % Glyzerin) für 15 min bei 65 °C assembliert. Wurde der Prä-Initiationskomplex in Anwesenheit von TFE geformt, wurde zusätzlich 15  $\mu\text{M}$  TFE zum Ansatz hinzugefügt und bei 65 °C für 10 min inkubiert [22, 49]. Der Elongationskomplex bestand aus 0,1  $\mu\text{M}$  fluoreszenzmarkierter RNAP, 3,3  $\mu\text{M}$ /26,7  $\mu\text{M}$  kS<sub>Elongation</sub>/RNA, 5,3  $\mu\text{M}$  nkS<sub>Elongation</sub>, 6,7 mM DTT, 0,07 mg/ml BSA und 1 x TMNE Puffer [38]. Der Einfluss des Elongationsfaktors Spt4/5 auf den Elongationskomplex wurde durch Zugabe von 20  $\mu\text{M}$  Spt4/5 und weitere Inkubation bei 65 °C für 10 min untersucht [22, 43]. Die unspezifische Bindung zwischen RNAP und Promoter DNA wurde verringert, indem 0,8 mg/ml Heparin zu den assemblierten Komplexen zugegeben und bei 65 °C für 10 min inkubiert wurde. Für die Einzelmolekülfluoreszenzmessungen wurden die assemblierten Komplexe jeweils auf 10 - 100 pM mit 0,5 x TMNE Puffer verdünnt.

### 3.5 Bestimmung des Försterradius

Um den Försterradius des FRET-Paares DyLight 550 - DyLight 650 zu bestimmen, wurde das Emissionsspektrum des Donors (500 - 800 nm mit der Anregungswellenlänge 550 nm) und das Absorptionsspektrum des Akzeptors (500 - 800 nm) mit dem Fluo-

reszenzspektrometer (Varian, Cary Eclipse) aufgenommen. Aus den normierten Spektren wurde anschließend das Überlappintegral  $J(\lambda)$  bestimmt (s. Gleichung (18)):

$$J(\lambda) = \int_0^{\infty} F_D(\lambda) \varepsilon_{\lambda}(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (18)$$

mit  $F_D(\lambda)$ , dem auf die Fläche normierten Emissionsspektrum des Donors,  $\varepsilon_{\lambda}(\lambda)$ , dem wellenlängenabhängigen Extinktionskoeffizienten des Akzeptors (normiertes Absorptionsspektrum multipliziert mit dem Extinktionskoeffizienten des Akzeptors) und  $\lambda$ , der Wellenlänge. Die Quantenausbeute von DyLight 550 wurde relativ zum Farbstoff Atto 532 berechnet.

Die Farbstoffe wurden in 1 x PBS verdünnt (Absorbanz sollte unter 0,1 liegen, um nicht-lineare Effekte zu vermeiden) und anschließend Absorptionsspektren aufgenommen. Die Emissionsspektren für DyLight 550 und Atto532 wurden bei der Anregungswellenlänge 532 nm zwischen 640 - 800 nm bestimmt und die integrierten Werte gegen die jeweilige Absorbanz aufgetragen. Durch Vergleich der beiden Steigungen der resultierenden Ursprungsgeraden konnte die Quantenausbeute ausgelesen werden. Die Quantenausbeute von Atto532 beträgt  $\Phi_{f,Atto532} = 0,90$  [97] und somit konnte die Quantenausbeute von DyLight 550 zu 0,14 berechnet werden. Der Försterradius wurde mit der Gleichung (19):

$$R_0 = \sqrt[6]{8.8 \cdot 10^{-28} \text{ mol} \cdot \kappa^2 \cdot \Phi_D \cdot J \cdot n^{-4}} \quad (19)$$

berechnet, mit  $\kappa^2 = 2/3$ ,  $n=1,33$ ,  $\Phi_D$  = Quantenausbeute des Donors und  $J$  das Überlappintegral [ $\text{nm}^6/\text{mol}$ ]. Für das Fluoreszenzfarbstoff-Paar DyLight 550 und DyLight 650 betrug somit der Försterradius 5,2 nm.

### 3.6 Anisotropie-Messungen

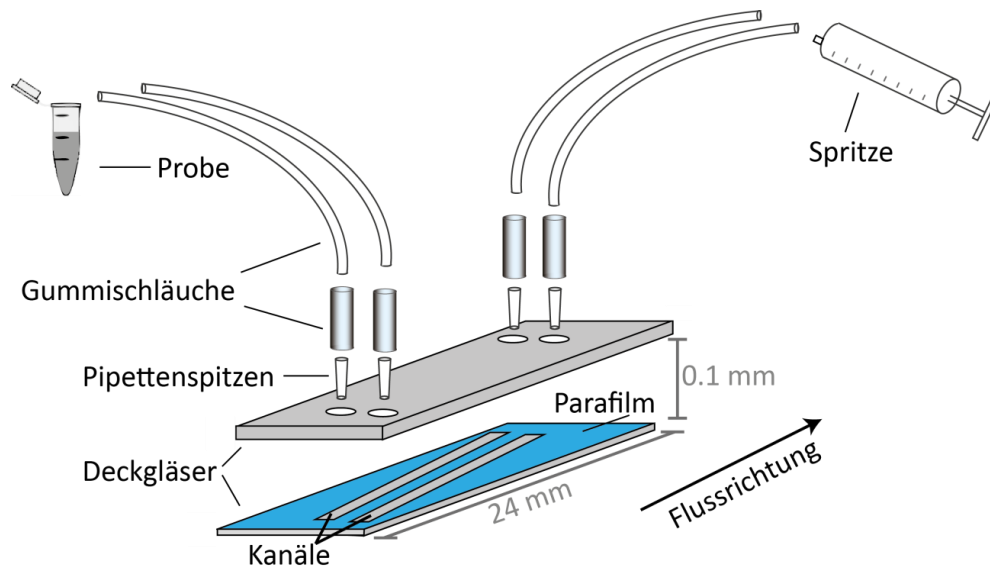
Die Fluoreszenzanisotropie-Messungen des jeweils RNAP-gekoppelten Donor- und Akzeptorfluorophors wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzspektrometers (Varian, Cary Eclipse) bei Raumtemperatur bestimmt. Dazu wurden jeweils die vertikalen oder horizontalen Emissionsintensitäten bei vertikal und horizontal polarisiertem Anregungslicht von einzeln markierten RNAP-Rpo1<sup>E257AzF\*DL550</sup> (Anregungswellenlänge: 562 nm; Schlitzweite: 10 nm; Emissionswellenlänge: 576 nm; Schlitzweite: 5 nm) sowie von einzeln markierten RNAP-Rpo2<sup>Q373AzF\*DL650</sup> (Anregungswellenlänge: 652 nm; Schlitzweite:

10 nm; Emissionswellenlänge: 672 nm; Schlitzweite: 5 nm) bei einer Integrationszeit von 15 s gemessen. Um den Einfluss der Transkriptionsfaktoren auf die Fluorophore an der RNAP zu testen, wurden die einzeln markierten RNAPs mit entweder 2  $\mu$ M TFE oder 20  $\mu$ M Spt4/5 (jeweils Endkonzentrationen) für 10 min bei 65 °C inkubiert. Die Anisotropie-Werte wurden mit der Gleichung (5) aus Kapitel 2.4.2 berechnet.

### 3.7 Präparation der Flusskammer und Immobilisierung der Proben

Die Flusskammern (s. Abbildung 3.7.1) für die Einzelmolekülmessungen bestanden aus einem 1 mm dicken Quarz-Objektträger und einem 0,17 mm dünnen Deckglas aus Borosilikatglas (Herstellung PEGylierter Oberflächen, s. Anhang A), die in einer Stapel-Bauweise mittels Parafilm zusammen gehalten wurden. Der Parafilm diente als Abstandshalter und Aussparungen darin definierten die Messkanäle. Im dickeren Deckglas befanden sich vier gebohrte Löcher (Größe: ca. 0,7 mm), die passend auf die beiden Kanäle gelegt wurden. Erhitzen auf ca. 100 °C führte zum luftblasenfreien Zusammenkleben von Objektträger und Deckglas. In die Löcher wurden gekürzte Pipettenspitzen gesteckt, mit ca. 1 cm langen Gummischläuchen ( $\varnothing_{\text{innen}}=1,6$  mm,  $\varnothing_{\text{außen}}=4,8$  mm, Roth) verstärkt und anschließend mit einem zwei-Komponenten-Kleber verklebt. Dünne Schläuche (Rotilabo-FEP-Schlauch,  $\varnothing_{\text{innen}}=0,8$  mm,  $\varnothing_{\text{außen}}=1,58$  mm, Roth) wurden in jeden der 4 Gummischläuche gesteckt, wobei zwei davon eine Kanüle trugen. Diese wurden ebenfalls mit einem zwei-Komponenten-Kleber verklebt.

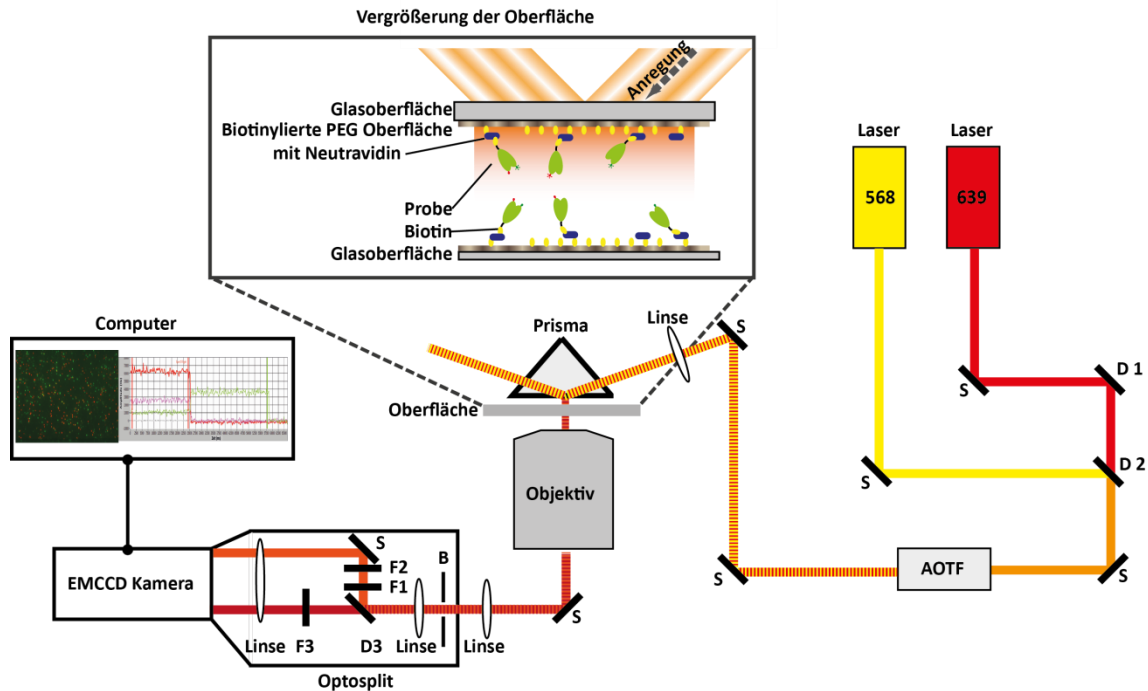
Die zu untersuchende Probe konnte mit dem losen Ende des dünnen Schlauchs mit Hilfe einer Spritze in die Flusskammer gezogen werden. Die Transkriptionskomplexe wurden für die Einzelmolekülfluoreszenzmessungen auf einer PEG-Oberfläche über eine Neutravidin-Biotin-Bindung immobilisiert. Dazu wurde die PEG-Oberfläche mit 0,1 mg/ml Neutravidin-Lösung im Vorfeld (Thermo Scientific) für 15 min inkubiert und anschließend mit 0,5 x TMNE-Puffer gespült.



**Abbildung 3.7.1:** Schematische Darstellung der Flusskammer für die Einzelmolekülmikroskopie. Die beiden Deckgläser wurden mittels Parafilm zusammengehalten. In die gebohrten Löcher im dickeren Deckglas wurden nacheinander gekürzte Pipettenspitzen und Gummischläuche geklebt. Die Probe kann mit Hilfe einer Spritze durch die Kammer gezogen werden und Pufferaustausch ist ebenfalls über den Spritzenzugang möglich.

### 3.8 Einzelmoleküldetektion mit Prisma-TIRF

Für die Zwei-Farben-FRET-Messungen wurde ein Prisma-TIRF Mikroskopaufbau (schematischer Aufbau ist in Abbildung 3.8.1 gezeigt) basierend auf einem inversen Fluoreszenzmikroskop (IX71, Olympus) mit alternierender Laseranregung eingesetzt. Es wurden ein gelber Festkörperlaser (568 nm, Coherent Sapphire, 110 mW) und ein roter Diodenlaser (639 nm, Toptica iBeam Smart 150 mW) verwendet, um den Donor und Akzeptor anzuregen. Das Laserlicht wurde über ein Spiegel (S)-Dichroiten (D1, D2; Semrock Beam Combiner)-System durch einen polychromatischen akustooptischen Modulator (AOTF, Crystal Technology) geleitet, der mit einer Bildfrequenz von 10 Hz das Laserlicht alterniert. Alternierende Spektroskopie liefert weitere Informationen über die Anwesenheit und den photophysikalischen Zustand der Donor- und Akzeptorfarbstoffmoleküle. So können die einzelmarkierten von den doppelmarkierten Komplexen unterschieden werden [98] und ausschließlich doppelt markierte Komplexe der Analyse zugeführt werden.



**Abbildung 3.8.1:** Schematischer Aufbau eines Prisma-TIRF Setups. Die beiden Laserstrahlen passieren den polychromatischen akusto-optischen Modulator (AOTF), welcher die Strahlen alterniert. Die Anregungsstrahlen werden weiter auf die Oberfläche geleitet, wo die Farbstoffmoleküle zum fluoreszieren angeregt werden. Das Emissionslicht wird durch das Objektiv eingesammelt und spektral mit einem Dichroiten getrennt. Die Detektion erfolgt mit Hilfe der EMCCD-Kamera.

Die Laserstrahlen wurden mit einer Linse fokussiert und trafen unter einem Winkel von ca.  $68^\circ$  auf ein Prisma, wodurch ein evaneszentes Feld durch Totalreflexion an der Grenzfläche zwischen Deckglas und der Probenlösung erzeugt wurde. Das evaneszente Feld besitzt nach Gleichung (16) eine Eindringtiefe  $d$  von 179 nm für den gelben Laser (568 nm) und von 201 nm für den roten Laser (639 nm). Dadurch wurden die mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Proben an der Oberseite der Flusskammer angeregt, während durch die Abnahme des evaneszenten Feldes die markierten Proben an der Unterseite der Flusskammer nicht angeregt wurden. Das Fluoreszenzlicht wurde durch ein Wasserobjektiv (60 x Olympus 1,20 N.A.) gesammelt, durch einen Spiegel (S) abgelenkt und mit Hilfe einer Linse, in deren Brennpunkt sich eine weitere Linse befindet, in den Optosplit geleitet. Eine weitere Linse sorgte für einen parallelen Strahlenverlauf des Fluoreszenzlichts, welches mit Hilfe eines Dichroiten (640 DCXR, Chroma Technology (D3)) in zwei Wellenlängenbereiche (über 640 nm und unter 640 nm) getrennt wurde. Mit den Bandpassfiltern (Semrock BrightLine 582/75 (F1) und Semrock Bright-Line 609/54 (F2)) wurde das Fluoreszenzlicht im gelben Kanal sowie mit dem Langpassfilter (647 nm Semrock RazorEdge (F3)) im nahen infraroten Kanal weiter gefiltert und anschließend nebeneinander auf eine EMCCD-Kamera (Andor IXon X3, pre-

Gain 5.1, Gain 250, Bildfrequenz 10 Hz) gelegt. Pro Messung wurden zwischen 40-60 Videos mit jeweils einer Frame-Anzahl von 500 - 850 im .spe-Format gespeichert.

### 3.9 Sauerstoffentzug und ROXS

Die Photostabilität der Fluorophore wurde durch Verwendung eines Sauerstoffentzugssystems und von Trolox/Trolox-Quinon (TXQ) deutlich verbessert. Die Lösung des Sauerstoffentzugssystems enthielt 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 12,5 mM KCl; 50 % (v/v) Glycerin; 10 % (v/v) Glukose-Oxidase (Type VII, G2133-10KU, Sigma Aldrich); 0,4 % (v/v) Katalase (Bovine Liver, C100-50 MG, Sigma Aldrich) und 0,4 % (v/v) einer 0,5 M Tris(2-carboxyethyl)phosphinhydrochlorid-Lösung (TCEP, Sigma Aldrich). Dies wurde in einer Verdünnung von 1:10 zum Messpuffer 0,5 x TMNE hinzugefügt. Zusätzlich enthielt der Messpuffer 2 mM Trolox/TXQ und 1 % Glukose.

### 3.10 Datenauswertung

Die von der EMCCD-Kamera aufgenommenen Videos wurden mit einer Software, die auf LabVIEW 2012 64bit (National Instruments) basiert, ausgewertet. Dazu wurden die Videos in die Software geladen und der Donor- und Akzeptorkanal als Bild, das über eine Mittelung der ersten 50 Frames entstand, dargestellt. Die beiden Kanäle wurden übereinandergelegt und die kolokalisierten Moleküle mit einem automatischen Algorithmus zur Molekülspotfindung ausgewählt. Die chromatische Aberration konnte durch Verzerren der Bilder in x- und y-Richtung minimiert werden. Nach der Überlagerung der beiden Kanäle wurden nur Moleküle für die Analyse ausgewählt, die jeweils einen grünen und roten Farbstoff aufwiesen (gelbe Spots, s. Abbildung 3.10.1). Einfach markierte Moleküle wurden aussortiert und für die weitere Auswertung nicht verwendet. Anschließend wurden die Intensitätsspurten über die Zeit generiert (s. Abbildung 3.10.1). Die Farben entsprechen jeweils folgender Anregung und Detektion (in Klammern): Rot (rot/rot), Grün (grün/grün), Violett (grün/rot=FRET). Für die Berechnung der absoluten Distanzen reicht die Gleichung (12) für die FRET-Effizienz nicht aus, sondern es müssen noch zusätzliche Korrekturfaktoren herangezogen werden. Die Intensitätsspurten wurden hinsichtlich ihres Hintergrundes, der direkten Anregung des Akzeptors durch den 568 nm Laser ( $\alpha$ ), der Detektion der Donorfluoreszenz im Akzeptorkanal (spektrales Übersprechen,  $\beta$ ) und des Gammafaktors  $\gamma$  korrigiert. Unter Einbeziehung der Korrekturfaktoren erweitert sich die Gleichung (12) zur Berechnung der FRET-Effizienz wie folgt (Gleichung (20)):



$$E_{korrigiert} = \frac{I_A - \beta I_D - \alpha I_A^{direkt}}{I_A - \beta I_D - \alpha I_A^{direkt} + \gamma I_D} \quad (20)$$

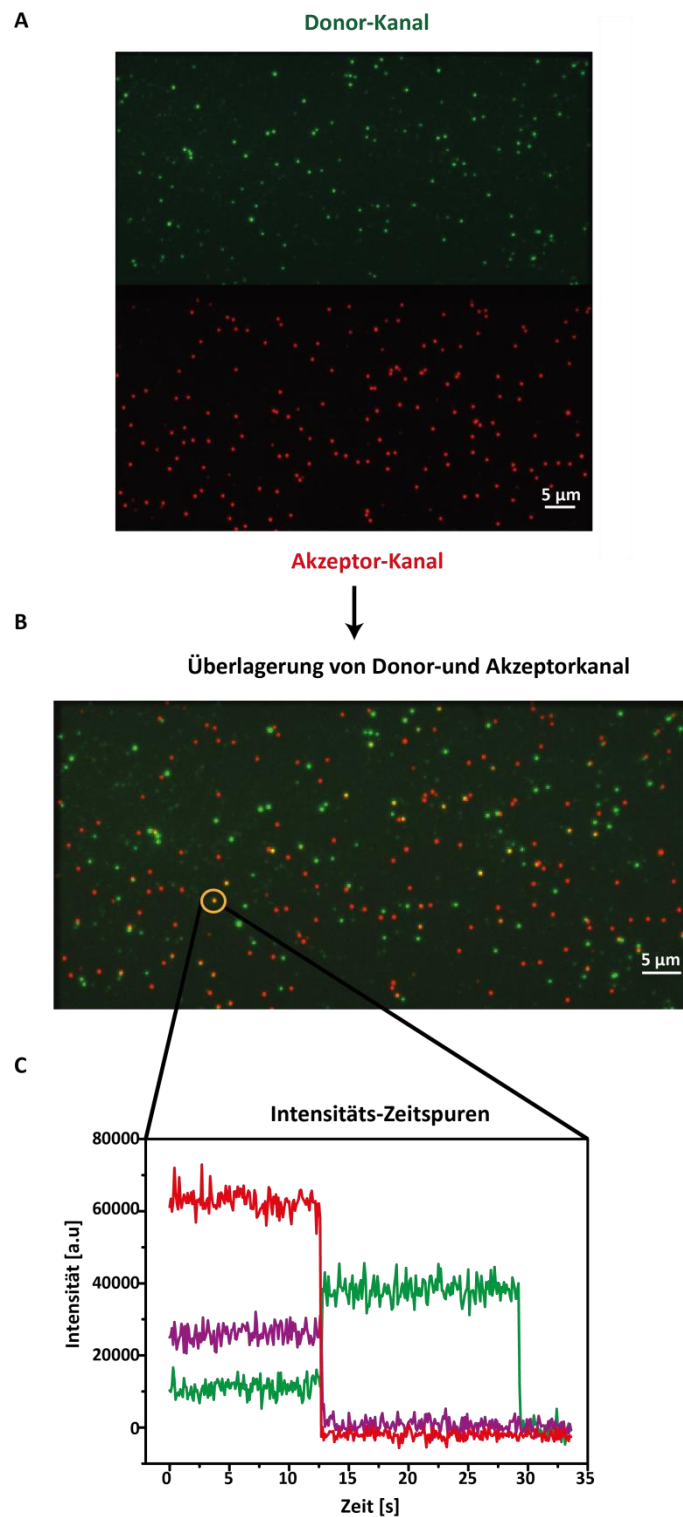
mit  $I_A$  der Akzeptorintensität,  $I_D$  der Donorintensität und  $I_A^{direkt}$  der Akzeptorintensität bei direkter Anregung. Die Korrektur der direkten Anregung  $\alpha$  fand bei Spuren, in denen der Donor vor dem Akzeptor blich, und die Korrektur des spektralen Übersprechens  $\beta$  fand bei Spuren, bei denen der Akzeptor vor dem Donor blich, statt:

$$\alpha = \frac{I''_A}{I_A^{dir}} \quad (21)$$

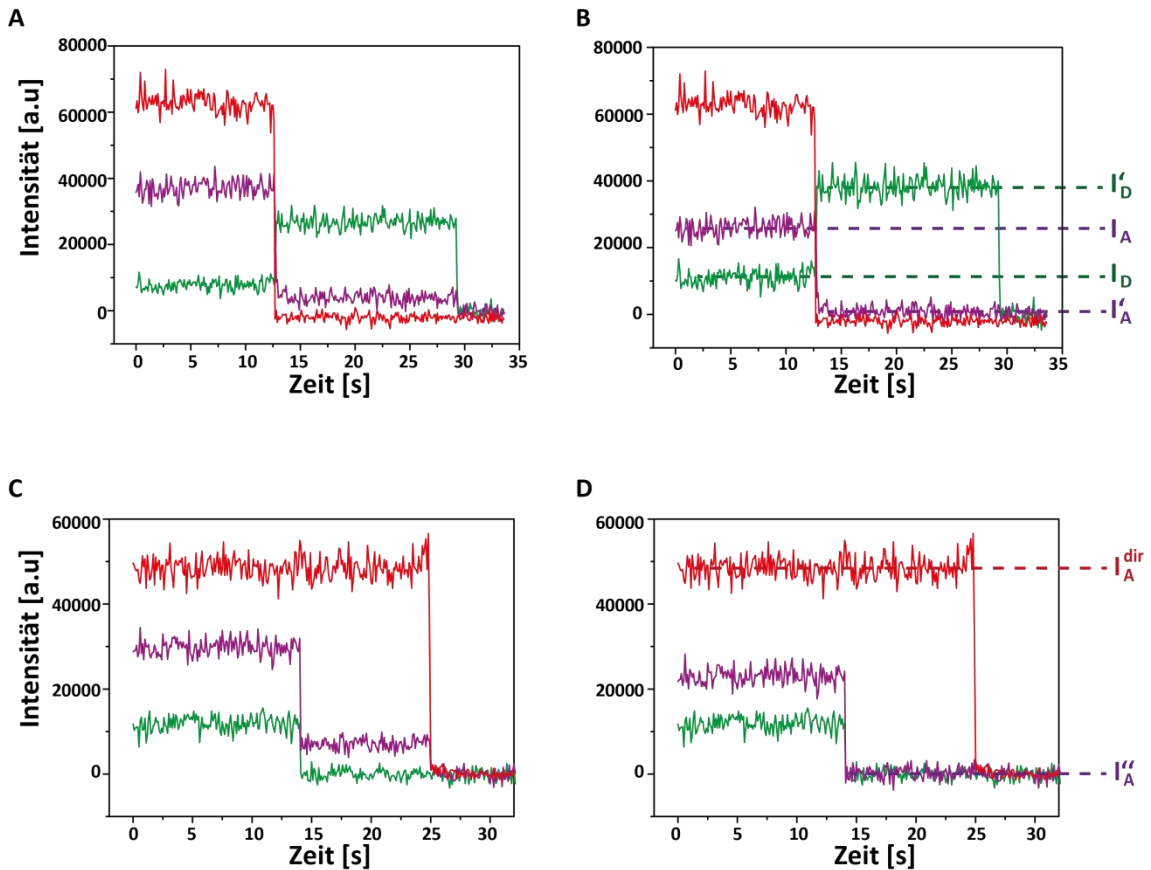
$$\beta = \frac{I'_A}{I'_D} \quad (22)$$

Der Gamma-Faktor  $\gamma$  berücksichtigt die unterschiedlichen Quantenausbeuten ( $\Phi_D$ ,  $\Phi_A$ : Quantenausbeute des Donors bzw. Akzeptors) und die unterschiedlichen Detektionseffizienzen ( $\eta_D$ ,  $\eta_A$ : Detektionseffizienz des Donors bzw. Akzeptors) der zwei Fluorophore:

$$\gamma = \frac{\Phi_A \cdot \eta_A}{\Phi_D \cdot \eta_D} \quad (23)$$



**Abbildung 3.10.1:** (A) EMCCD-Kamera-Bild der fluoreszierenden Moleküle, die auf der Quarzoberfläche immobilisiert und nach Donor- und Akzeptorkanal getrennt wurden sowie (B) die Überlagerung der beiden Kanäle (Darstellung in Falschfarben). Die Bilder wurden hinsichtlich ihrer Detektionskanäle grün und rot eingefärbt (C) Exemplarische Intensitäts-Zeitspur eines einzelnen Moleküls, das einen Akzeptor- und Donorfarbstoff trägt. Die rote und violette Spur entsprechen jeweils dem Akzeptor-Molekül mit roter/grüner Anregung und roter Detektion und die grüne Spur entspricht dem Donor-Molekül mit grüner Anregung und grüner Detektion.



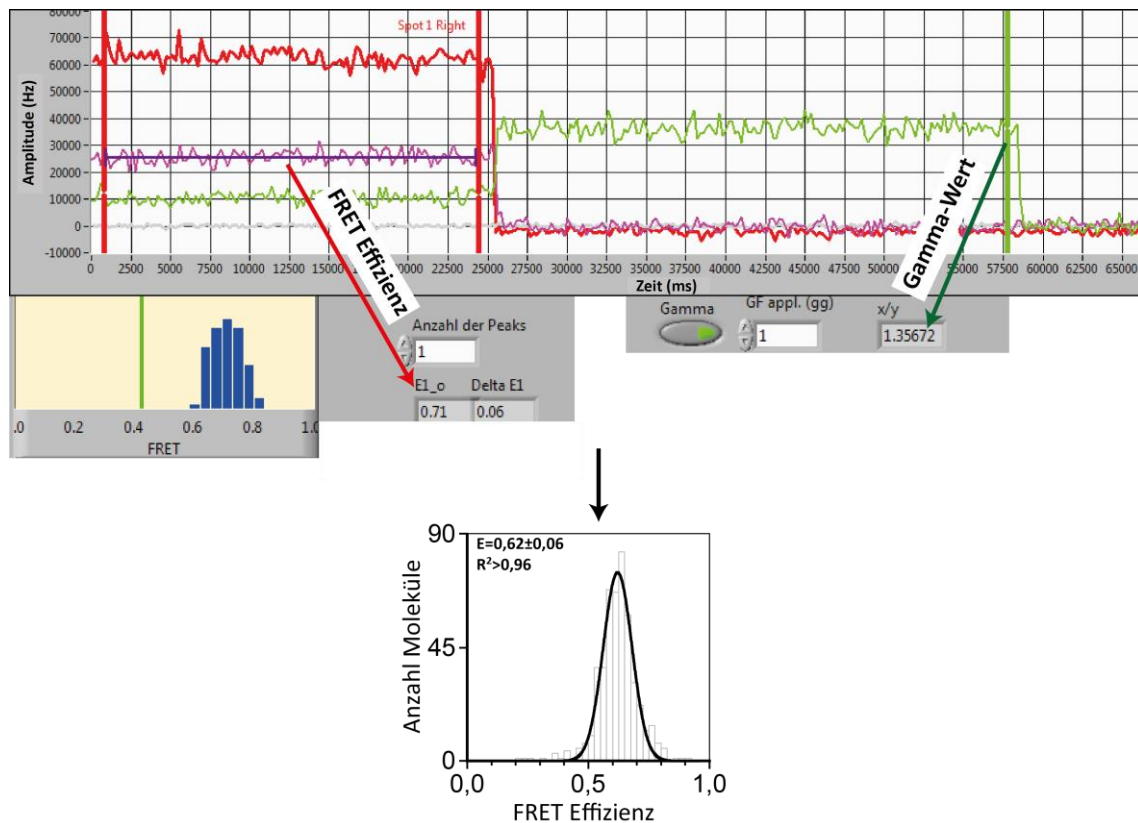
**Abbildung 3.10.2:** Typische Einzelmolekülspuren mit und ohne Korrekturfaktoren. Die rote Spur entspricht der Fluoreszenzintensität eines fluoreszenzmarkierten Moleküls bei roter Anregung und roter Detektion, die violette Spur entspricht grüner Anregung und roter Detektion und die grüne Spur entspricht grüner Anregung und grüner Detektion **(A)** Der Akzeptor (rot, violett) bleicht vor dem Donor (grün) und es können **(B)** die Korrekturfaktoren  $\beta$  und  $\gamma$  bestimmt werden. **(C)** Der Donor (grün) bleicht vor dem Akzeptor (rot, violett) und aus dieser Spur kann **(D)** der Korrekturfaktor  $\alpha$  bestimmt werden.

Es wurden nur Spuren ausgewählt, bei denen der Akzeptor vor dem Donor einen Bleichschritt aufwies, da nur bei diesen Spuren der Gammafaktor bestimmt werden konnte. Dieser wurde experimentell für jede einzelne FRET-Spur folgendermaßen bestimmt:

$$\gamma = \frac{I_A - I'_A}{I'_D - I_D} \quad (24)$$

D.h. die Summe aus der mittleren Donor-Intensität und der mittleren Akzeptor-Intensität ist vor ( $I_D$ ,  $I_A$ ) und nach ( $I'_D$ ,  $I'_A$ ) dem Bleichen des Akzeptors konstant. In Abbildung 3.10.2 sind exemplarisch Spuren ohne und mit Korrekturfaktoren dargestellt. Die Korrekturfaktoren  $\alpha$  (11%) und  $\beta$  (18%) wurden für alle weiteren Spuren eines Videos beibehalten. Die Auswahl der auszuwertenden Bereiche erfolgte für jede Spur

manuell mit Hilfe von Cursors. Zwei Cursor (rot) definierten dabei den Bereich für die Bestimmung des mittleren FRET-Wertes und ein dritter Cursor (grün) wurde für die Bestimmung des Gammafaktors benötigt. Dieser wurde am Ende des Bleichschritts des Donors angelegt (s. Abbildung 3.10.3). Die daraus resultierenden korrigierten FRET-Werte wurden in einem Histogramm dargestellt und entweder mit ein oder zwei Gaußfunktionen angepasst. Der mittlere FRET-Wert und die Standardabweichung konnten aus dem Gauß-Fit entnommen werden und die absoluten Abstände mit Hilfe der Gleichung (20) berechnet werden.

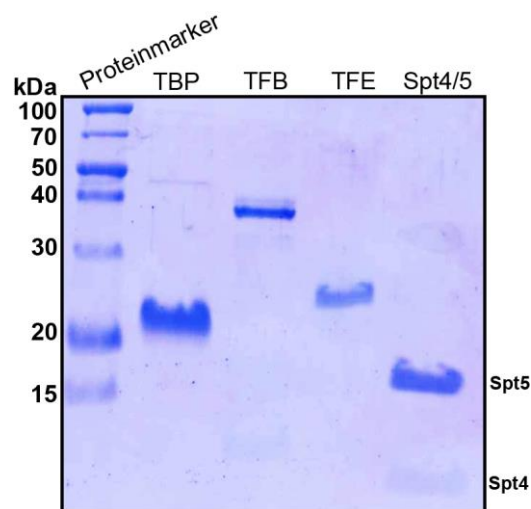


**Abbildung 3.10.3:** Extraktion der FRET-Effizienz und des Gamma-Wertes mit Hilfe der Cursor aus der Intensitäts-Zeitspur. Mehrere hundert korrigierte FRET-Werte wurden anschließend in einem Histogramm dargestellt und mit Hilfe einer oder zwei Gaußfunktionen der Erwartungswert bestimmt. Die mittlere FRET-Effizienz und die Standardabweichung konnten ausgelesen werden.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Expression und Reinigung der Transkriptionsfaktoren

Die Transkriptionsfaktoren TBP, TFB, TFE und Spt4/5 wurden wie in den Abschnitten 3.1.2.1, 3.2.1.2, 3.2.3.1, 3.2.3.2 beschrieben, exprimiert und gereinigt. Die entsprechenden Chromatogramme der FPLC-Läufe und die dazugehörigen SDS-Gele, welche die jeweiligen Elutionsfraktionen zeigen, befinden sich im Anhang B. In Abbildung 4.1.1 sind die gereinigten Transkriptionsfaktoren auf einem 15%-SDS-Gel aufgetragen. Die einzelnen Molekulargewichte und Extinktionskoeffizienten sind in Tabelle 4.1.1 zusammengefasst. Die Konzentrationen wurden entweder über den Bradford-Assay oder über Absorptionsmessungen bestimmt. Typische Konzentrationen der Faktoren lagen zwischen 50 - 200  $\mu\text{M}$ .



**Abbildung 4.1.1:** 15% SDS-PAGE von den gereinigten Transkriptionsfaktoren TBP, TFB, TFE und Spt4/5

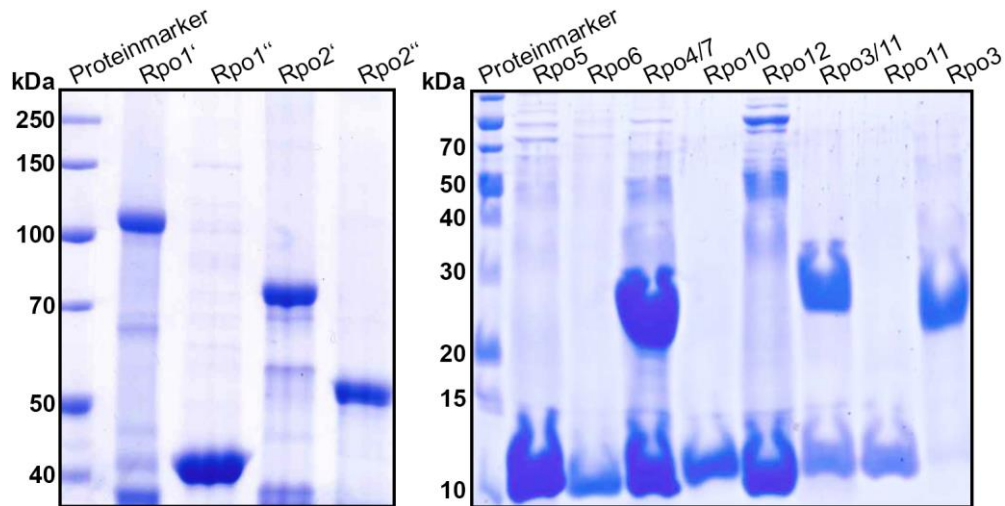
Transkriptionsfaktor	Molekulargewicht [kDa]	Extinktionskoeffizient [ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ]
TBP	20,2	4470
TFB	38,3	36900
TFE	20,7	26930
Spt4	6,6	8480
Spt5	16,1	2980

**Tabelle 4.1.1:** Molekulargewicht und Extinktionskoeffizient der einzelnen Transkriptionsfaktoren

### 4.2 Expression und Reinigung der RNAP Untereinheiten

Alle RNAP Untereinheiten (Wildtyp-Varianten) wurden wie in den Abschnitten 3.1.2.1, 3.2.1, 3.2.2, 3.2.3.1 beschrieben, exprimiert und gereinigt. Die entsprechenden Chro-

matogramme der FPLC-Läufe sowie die dazugehörigen SDS-Gele, welche die jeweiligen Elutionsfraktionen zeigen, befinden sich im Anhang B. In Abbildung 4.2.1 sind die gereinigten Untereinheiten, je nach ihrer Größe, entweder auf ein 10% oder 16%-SDS-Gel aufgetragen und in Tabelle 4.2.1 sind die Molekulargewichte und Extinktionskoeffizienten der einzelnen RNAP Untereinheiten zusammengefasst. Die Untereinheiten Rpo4/7 und Rpo3/11 wurden koexprimiert und daher sind jeweils zwei Proteinbanden im SDS-Gel zu erkennen.



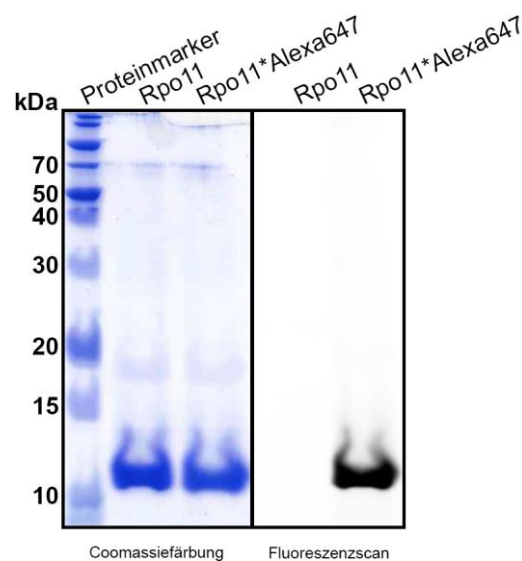
**Abbildung 4.2.1:** Links: 10% SDS-PAGE von den gereinigten katalytischen RNAP Untereinheiten Rpo1', Rpo1'', Rpo2' und Rpo2''. Rechts: 16%SDS-Gel von den gereinigten RNAP Untereinheiten Rpo5, Rpo6, Rpo4/7, Rpo10, Rpo12, Rpo3/11, Rpo11 und Rpo3.

RNAP Untereinheit	Molekulargewicht [kDa]	Extinktionskoeffizient [M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]
Rpo1'	100,5	77670
Rpo1''	43,4	21890
Rpo2'	72,2	48250
Rpo2''	56,5	39310
Rpo3	21,7	11460
Rpo4	12,3	10430
Rpo5	9,0	4470
Rpo6	6,3	2980
Rpo7	21,2	18910
Rpo10	8,7	5960
Rpo11	11,4	2980
Rpo12	5,4	2980

**Tabelle 4.2.1:** Molekulargewicht und Extinktionskoeffizient der einzelnen RNAP Untereinheiten

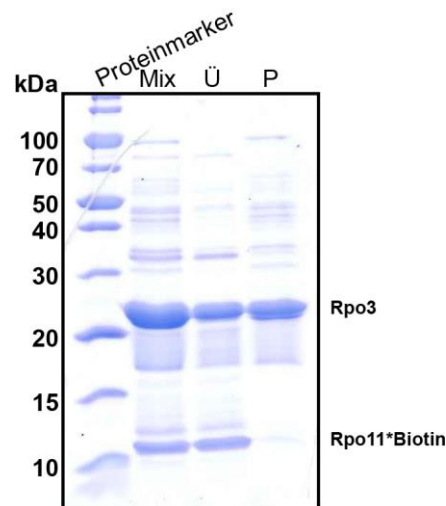
### 4.3 Ortsspezifischer Einbau von Biotin in Rpo11 und Assemblierung Rpo3/11-Biotin

Die Konzentration des freien Cysteins in der RNAP Untereinheit Rpo11<sup>C88</sup> wurde mit Hilfe des Ellmann's Test zu 158  $\mu\text{M}$  bestimmt. Die Reaktivität des Cysteins in Rpo11<sup>C88</sup> und die Modifikation dieses Cysteins mit 10-fachem Überschuss an Biotin-Maleimid (4°C, über Nacht) wurde überprüft, indem Rpo11<sup>C88</sup> parallel dazu mit 10-fachem Überschuss mit modifiziertem Farbstoff Alexa647-Maleimid markiert (4°C, über Nacht) und ein Fluoreszenzscan durchgeführt wurde (s. Abbildung 4.3.1). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,5%  $\beta$ -Mercaptoethanol gestoppt.



**Abbildung 4.3.1:** 16% SDS-PAGE von der nicht markierten RNAP Untereinheit Rpo11 und mit dem Fluorophor Alexa647 markierten Rpo11. *Links:* Coomassiefärbung; *Rechts:* Fluoreszenzscan

Für die Assemblierung wurden Rpo11<sup>C88</sup>-Biotin und Rpo3 im Volumenverhältnis 1 : 9 eingesetzt. Nach Denaturierung der RNAP Untereinheiten mit Harnstoff, wurde eine schrittweise Dialyse mit einem harnstofffreien Puffer durchgeführt, was zur Rückfaltung des Rpo3/11-Komplexes führte (s. Kapitel 3.2.8). Die Lösung wurde anschließend auf 65°C für 20 min erhitzt und bei 13000 x g für 20 min zentrifugiert. Die Rpo3/11-Lösung vor Dialyse, der Überstand und das Pellet nach Hitzeinaktivierung und Zentrifugation wurden auf einem 16%-SDS-Gel aufgetragen (s. Abbildung 4.3.2). Der Überstand, der nativ gefaltetes Rpo3/11 enthält, wurde für die Assemblierung einer dreifachmarkierten RNAP weiterverwendet. Rpo3/11 liegt als stabiler und löslicher Heterodimer-Komplex vor [99], während Rpo3 in Abwesenheit von Rpo11 unlöslich ist und der Überschuss von Rpo3 daher im Pellet vorliegt.

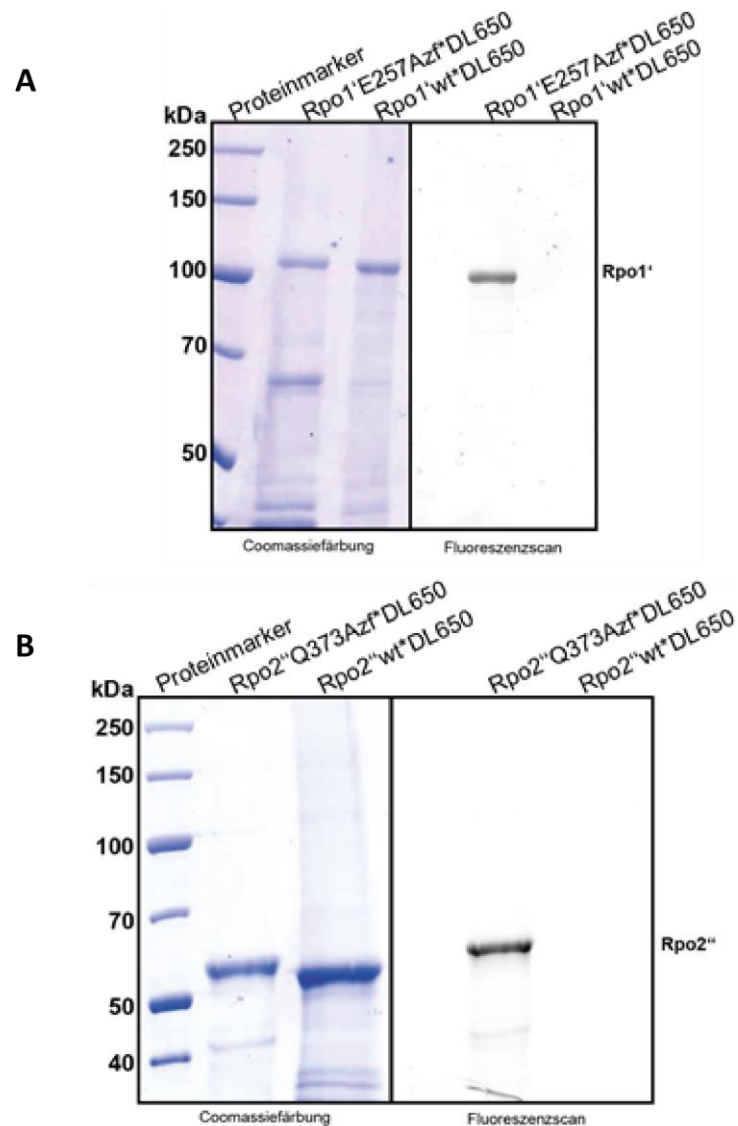


**Abbildung 4.3.2:** 16% SDS-PAGE von der Assemblierung Rpo3/11<sup>C88</sup>-Biotin. Aufgetragen sind die Rpo3/11-Lösung vor Dialyse (Mix), der Überstand (Ü) und das Pellet (P) nach Hitzeinaktivierung und Zentrifugation.

#### 4.4 Ortsspezifischer Einbau von Fluorophoren in die RNAP Untereinheiten Rpo1<sup>,E257Azf</sup> und Rpo2<sup>,Q373Azf</sup>

Der spezifische Einbau von Fluorophoren in die RNAP Untereinheiten Rpo1<sup>,E257Azf</sup> und Rpo2<sup>,Q373Azf</sup> erfolgte über die Amber-Suppressionsstrategie. Durch Zugabe der unnatürlichen Aminosäure *p*-Azido-L-Phenylalanin zum Expressionsmedium konnte das Voll-längenprodukt für beide Untereinheiten erreicht werden. Fehlte stattdessen die unnatürliche Aminosäure, so wurden nur die Fragmente 1-257 für Rpo1' bzw. 1-373 für Rpo2'' translatiert (Abbruchprodukt). Die Voll-längenprodukte konnten anschließend mit Hilfe der Staudinger Ligation (Farbstoffe: DyLight 550 oder DyLight 650) spezifisch markiert werden, während die Inkubation der Wildtyp-Varianten mit einem DyLight-Farbstoff keine entsprechende Bande im Fluoreszenzscan hervorrief (s. Abbildung 4.4.1). Die Banden der markierten Untereinheiten besitzen eine höhere Laufhöhe als die Wildtyp-Varianten, da der Fluorophor zusätzlich zum Molekulargewicht beiträgt.





**Abbildung 4.4.1:** 10% SDS-PAGE: Spezifische Markierung über die Staudinger Ligation der RNAP Untereinheiten **(A)** Rpo1<sup>E257Azf</sup> **(B)** und Rpo2<sup>''Q373Azf</sup> mit DyLight 650 im Vergleich zu den Wildtyp-Varianten Rpo1' und Rpo2'', welche nicht markiert wurden. *Links:* Coomassiefärbung; *Rechts:* Fluoreszenzscan bei roter Anregung.

## 4.5 Assemblierung der RNAP

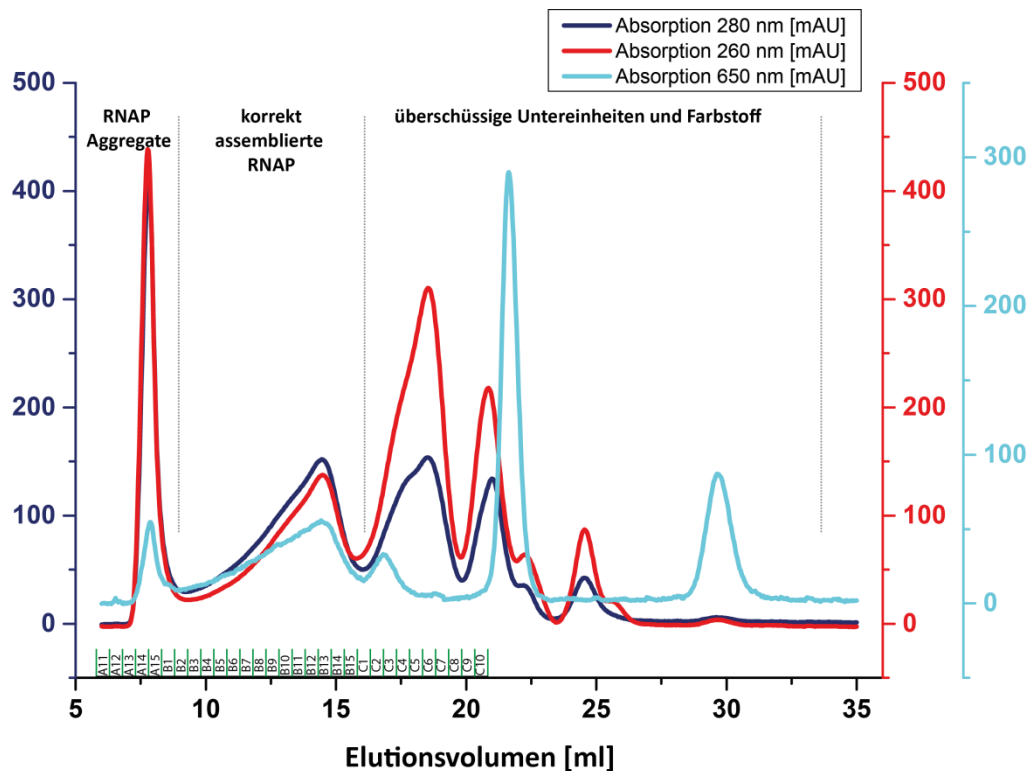
Für die Assemblierung der RNA Polymerasen *in vitro* wurden entweder nur unmarkierte Untereinheiten oder unmarkierte und Farbstoff- oder Biotinmodifizierte Untereinheiten verwendet. Nach Assemblierung wurden die RNAPs auf ca. 250 µl konzentriert und Aggregate, der Überschuss an löslichen Untereinheiten und nicht gekoppelter Farbstoff mit Hilfe einer Gelfiltrationssäule (Superose 6, GE Healthcare) abgetrennt. Die Abbildung 4.5.1 zeigt ein typisches Chromatogramm und das dazugehörige 10%-SDS-Gel mit den zugehörigen Elutionsfraktionen (s. Abbildung 4.5.2). Die Fraktionen, die eine

gleichmäßige Verteilung der katalytischen Untereinheiten aufwiesen, wurden vereinigt und mit Hilfe eines Konzentrators konzentriert. Die Proteinkonzentrationen und die Markierungseffizienz wurden folgendermaßen berechnet:

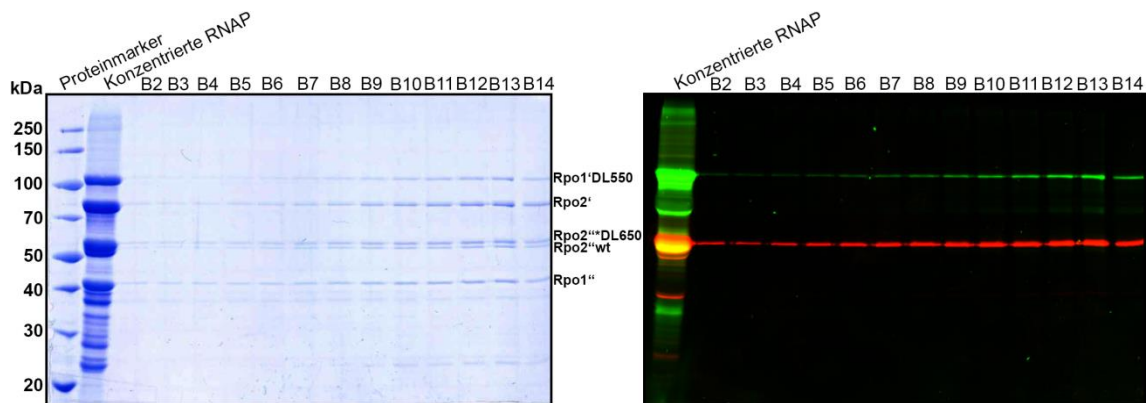
$$\text{Proteinkonzentration} = \frac{A_{280\text{nm}} - (A_{\text{max}} \times \text{KF})}{\varepsilon_{\text{P}}}$$

$$\text{Markierungseffizienz} = 100\% \times \left[ \frac{A_{\text{max}}}{\varepsilon_{\text{F}} \times \text{Proteinkonzentration}} \right]$$

mit  $A_{280\text{nm}}$  der Absorbanz bei 280 nm,  $A_{\text{max}}$  der Absorbanz bei entweder 550 nm oder 650 nm (je nach eingesetztem Fluorophor), KF dem Korrekturfaktor,  $\varepsilon_{\text{P}}$  und  $\varepsilon_{\text{F}}$  den Extinktionskoeffizienten des Proteins bzw. des Farbstoffs. Der Korrekturfaktor berücksichtigt den zusätzlichen Beitrag der Absorbanz bei 280 nm durch den Farbstoff und beträgt für DyLight 550: KF=0,0806 und für DyLight 650: KF=0,0371. Typische Proteinkonzentrationen lagen zwischen 3 - 8  $\mu\text{M}$  und die Markierungseffizienz zwischen 13 - 20%. Daraus ergab sich eine Ausbeute an doppelt markierten RNA Polymerasen von 2 - 4%.

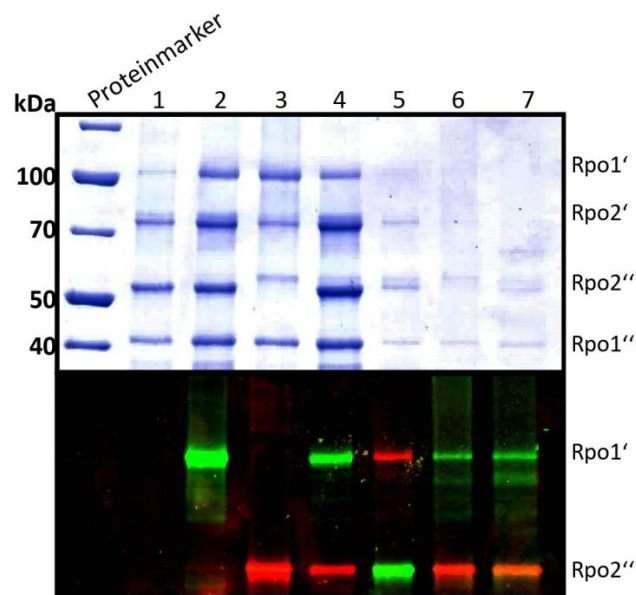


**Abbildung 4.5.1:** FPLC-Chromatogramm: Der Assemblierungsansatz wurde auf die Gelfiltrationssäule (Superose 6) mit dem Laufpuffer P<sub>100</sub>/β-Mercaptoethanol geladen und darüber die korrekt assemblierte RNAP von den Aggregaten und den überschüssigen Untereinheiten und freien Farbstoff getrennt [30].



**Abbildung 4.5.2:** 10% SDS-PAGE der Elutionsfraktionen der Gelfiltrationssäule Superose 6. Aufgetragen ist die konzentrierte doppelt markierte RNAP ( $\text{Rpo1}^{\text{E257DyLight550}}$ ,  $\text{Rpo2}^{\text{Q373DyLight650}}$ ), die der injizierten Probe entspricht und die Elutionsfraktionen B2-B14. Links: Coomassiefärbung; Rechts: Fluoreszenzscan bei grüner (grüne Banden) und roter (rote Banden) Anregung.

Eine Auftrennung mittels 10% SDS-PAGE der korrekt assemblierten und konzentrierten RNAP zeigte (s. Abbildung 4.5.3) die katalytischen Untereinheiten ( $\text{Rpo1}'$ ,  $\text{Rpo1}''$ ,  $\text{Rpo2}'$ ,  $\text{Rpo2}''$ ), sowie im Fluoreszenzscan die entsprechenden markierten Untereinheiten im Donor-bzw. Akzeptorkanal des Fluoreszenzscanners.



**Abbildung 4.5.3:** 10% SDS-PAGE, das alle verwendeten RNA Polymerasen zeigt. Oben: Coomassiefärbung; Unten: Fluoreszenzscan. Die grünen Banden entsprechen der grünen Anregung und die roten Banden entsprechen der roten Anregung. (1) unmarkierte RNAP (2) RNAP  $\text{Rpo1}^{\text{DL550}}$  (3) RNAP  $\text{Rpo2}^{\text{DL650}}$  (4) RNAP  $\text{Rpo1}^{\text{DL550}}_{\text{Rpo2}^{\text{DL650}}}$  (5) RNAP  $\text{Rpo1}^{\text{DL650}}_{\text{Rpo2}^{\text{DL550}}}$  (6) RNAP  $\text{Rpo1}^{\text{DL550}}_{\text{Rpo2}^{\text{DL650}}}_{\text{Rpo11}^{\text{Biotin}}}$  (7) RNAP  $\Delta\text{Rpo6}_{\text{Rpo1}^{\text{DL550}}_{\text{Rpo2}^{\text{DL650}}}_{\text{Rpo11}^{\text{Biotin}}}}$ .

## 4.6 Messung der Anisotropie und zugängliches Volumen der Fluorophore

Die freie Rotation der Fluorophore DyLight 550 und DyLight 650 an der RNAP wurde überprüft, indem wie in Abschnitt 3.6 beschrieben, Anisotropie-Messungen in Ab- und Anwesenheit der Transkriptionsfaktoren TFE und Spt4/5 durchgeführt wurden. In Tabelle 4.6.1 sind die Ergebnisse zusammengefasst:

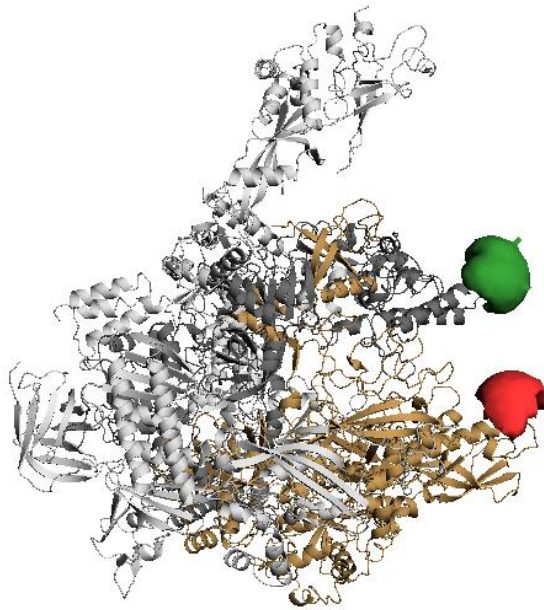
RNAP	Anisotropiewert
RNAP <sup>Rpo1</sup> *DL550	0,34
RNAP <sup>Rpo1</sup> *DL550 + Spt4/5	0,35
RNAP <sup>Rpo1</sup> *DL550 + TFE	0,35
RNAP <sup>Rpo2</sup> *DL650	0,28
RNAP <sup>Rpo2</sup> *DL650 + Spt4/5	0,29
RNAP <sup>Rpo2</sup> *DL650 + TFE	0,28
RNAP <sup>Rpo1</sup> *DL550_Rpo2*DL650	0,37/0,38

**Tabelle 4.6.1** Anisotropiewerte für einzeln markierte RNAP in Ab- und Anwesenheit der Transkriptionsfaktoren TFE und Spt4/5 und doppelt markierter RNAP.

Das zugängliche Volumen der Fluorophore in der RNAP konnte mit Hilfe einer Software (FPS: FRET positioning and screening, <http://www.mpc.hhu.de/software/fps.html>) simuliert werden (s. Abbildung 4.6.1). Dazu wurden die Ausdehnung der Fluorophore sowie die Linkerlänge und –breite benötigt. Die Linkerlänge sowie die Linkerbreite der an die RNAP gekoppelten Fluorophore wurden aus Grohmann *et. al* bzw. aus Nagy *et. al* [22, 49] übernommen. Da bislang wenig Informationen über die DyLight-Fluorophore existieren, diese jedoch laut Herstellerangaben ähnlich zu den Cyaninfarbstoffen Cy3 und Cy5 sein sollen, wurde deren Größe für die Berechnung des zugänglichen Volumens der DyLight-Fluorophore herangezogen. In Tabelle 4.6.2 sind die Parameter zusammengefasst:

Fluorophor	Linkerlänge [Å]	Linkerbreite [Å]	X [Å]	Y [Å]	Z [Å]	Atom ID
DyLight 550	12	4,5	6,8	3	1,5	1707
DyLight 650	15	4,5	11	3	1,5	9624

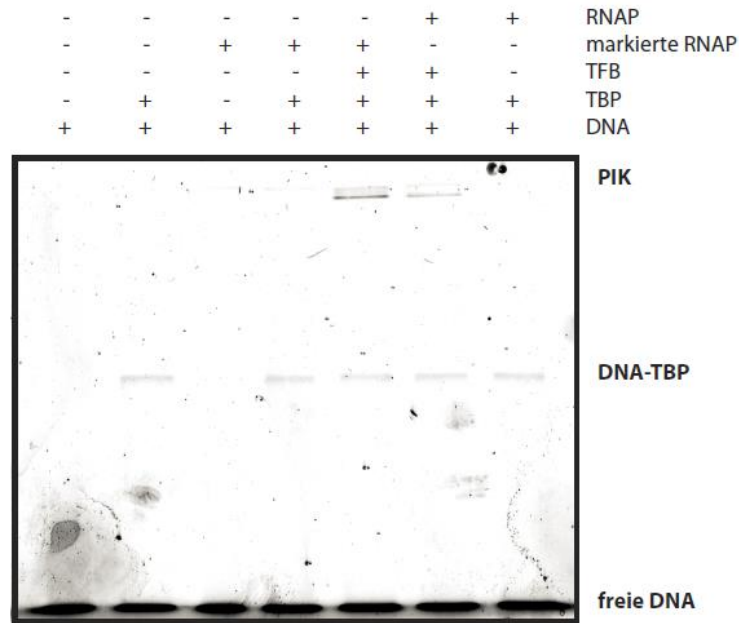
**Tabelle 4.6.2:** Zusammenfassung der Linkerlänge und –breite, der geometrischen Ausdehnung der Fluorophore DyLight 550 und DyLight 650 und der Atom ID. Die Atom ID gibt die Position in der verwendeten Kristallstruktur der RNAP aus *Sulfolobus shibatae* (PDB: 2WAQ) an, an welche die Fluorophore gekoppelt sind.



**Abbildung 4.6.1:** Kristallstruktur der RNAP aus *Sulfolobus shibatae* (PDB: 2WAQ). Die zugänglichen Volumina der Fluorophore DyLight 550 und DyLight 650 sind jeweils in grün bzw. rot gekennzeichnet.

## 4.7 Gelverzögerungsexperiment

Die Fähigkeit der fluoreszenzmarkierten RNAP einen Prä-Initiationskomplex (PIK) zu formen, wurde mit Hilfe eines 12% nativen Gels überprüft. Jeweils 10  $\mu$ l Probe wurden mit 10  $\mu$ l nativem Auftragspuffer vermischt (s. Kapitel 3.2.6, 3.4), auf das Gel geladen und bei 200 V für 50 min im Gel separiert. Ein anschließender Fluoreszenzscan mit blauer Anregung visualisierte die fluoreszenzmarkierte DNA. Je mehr Proteine an die DNA binden, desto langsamer bewegte sich diese aufgrund des erhöhten Molekulargewichts durch das Gel. Die Abbildung 4.7.1 zeigt die freie DNA<sup>Alexa488</sup>, den DNA<sup>Alexa488</sup>-TBP-Komplex und den PIK. Vergleich von nicht markierter und markierter RNAP zeigt, dass die markierte RNAP ebenfalls einen PIK bilden kann. Da der grüne Fluorophor DyLight 550 bei blauer Anregung ebenfalls schwach fluoresziert, wurde dies zusätzlich zur Fluoreszenz des Fluorophors Alexa488 detektiert. Somit ist die Intensität der PIK-Bande im Vergleich zu der Bande des PIK, das die unmarkierte RNAP enthielt, erhöht.

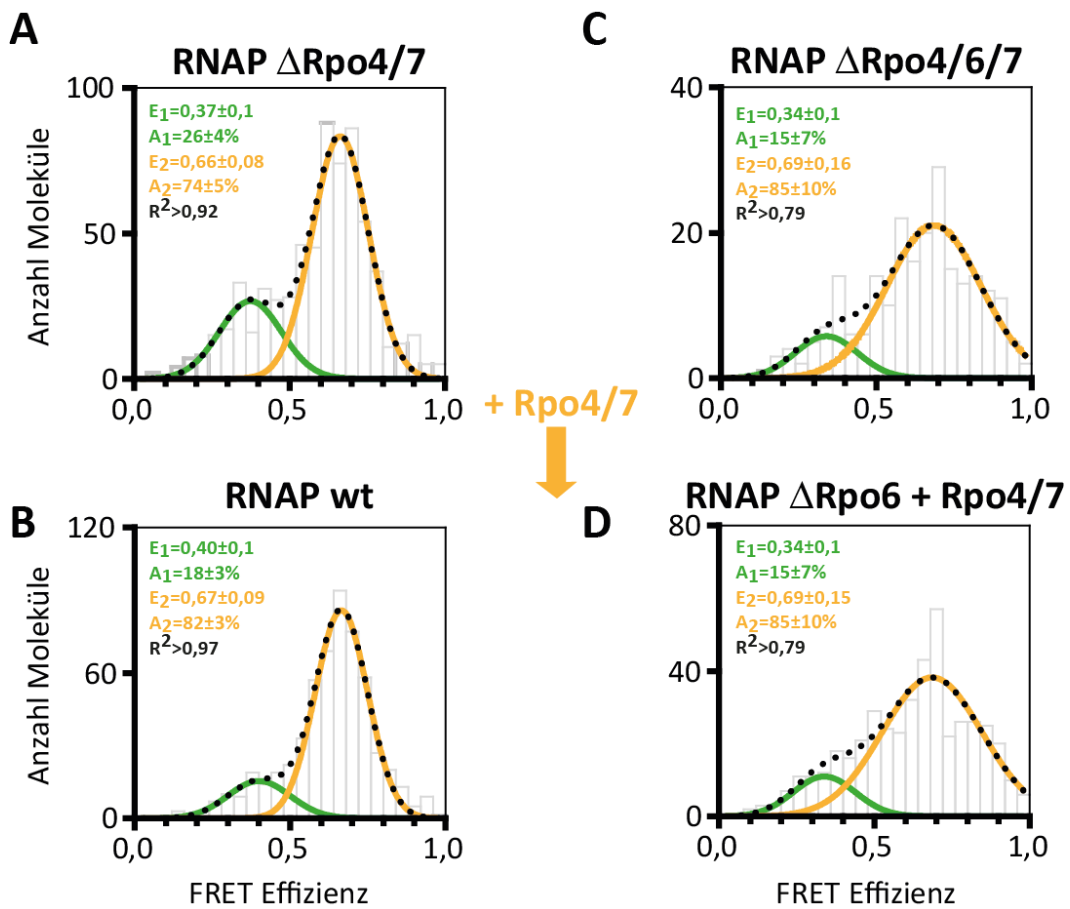


**Abbildung 4.7.1:** 12% native PAGE (EMSA). Es wurden 0,4  $\mu\text{M}$  RNAP, 8,7  $\mu\text{M}$  TBP, 13  $\mu\text{M}$  TFB und 133 nM DNA<sup>Alexa488</sup> für 20 min bei 65°C inkubiert und 0,8 mg/ml Heparin hinzugefügt und für weitere 10 min bei 65°C inkubiert. Die doppelt markierte RNAP bildet ebenfalls, wie die nicht markierte Variante, einen Prä-Initiationskomplex (übernommen und verändert nach [100]).

## 4.8 Konformation der RNAP Clamp in einer freien RNAP

Die Konformation der Clamp in einer freien RNAP, definiert als eine RNAP, die weder mit Nukleinsäuren oder Transkriptionsfaktoren interagiert, wurde für eine RNAP bestehend aus 10 Untereinheiten (RNAP $\Delta$ Rpo4/7) und für eine RNAP bestehend aus 12 Untereinheiten (RNAP Wildtyp) bestimmt. Die Immobilisierung erfolgte über ein Biotin an der Untereinheit Rpo11. Die dreifach markierten RNAPs wurden auf ca. 10 - 100 pM verdünnt und auf eine mit Neutravidin behandelte PEG-Oberfläche immobilisiert. Die einzelnen Moleküle wurden, wie in Kapitel 3.8 - 3.10 beschrieben, detektiert und ausgewertet. Die korrigierten FRET-Werte wurden anschließend in einem Histogramm dargestellt und mit zwei Gaußfunktionen angepasst. Die mittleren FRET-Effizienzen (E), die Standardabweichung, die prozentuale Verteilung der Populationen (A) und das korrigierte Bestimmtheitsmaß  $R^2$  sind in den Histogrammen angegeben. Die freie RNAP $\Delta$ Rpo4/7 Clamp nimmt zwei unterschiedliche Populationen ein (s. Abbildung 4.8.1 (A)). Ein Hauptmaximum befand sich bei einer FRET-Effizienz von  $E=0,66 \pm 0,08$  ( $74 \pm 5\%$ ) und ein kleineres Nebenmaximum bei  $E=0,37 \pm 0,1$  ( $26 \pm 4\%$ ). Um den Effekt von Rpo4/7 auf die RNAP Clamp zu testen, wurde ein 10-facher molarer Überschuss an Rpo4/7 mit RNAP $\Delta$ Rpo4/7 für 10 min bei 65°C inkubiert und anschließend für die

Einzelmolekülmessung verdünnt (s. Abbildung 4.8.1 (B)). Die Hauptpopulation bei  $E=0,67 \pm 0,09$  nahm um 8% zu, während gleichermaßen die Population bei der kleineren FRET-Effizienz abnahm. Das Anbinden von Rpo4/7 an die RNAP ist abhängig von der Untereinheit Rpo6 [42]. Dies wurde verifiziert, indem dreifach markierte RNAP $\Delta$ Rpo4/7/6 in Ab- und Anwesenheit von Rpo4/7 gemessen wurde. Rpo4/7 zeigte keinen Einfluss auf die mittleren FRET-Effizienzen, sowie auf deren Verteilung (s. Abbildung 4.8.1 (C), (D)).

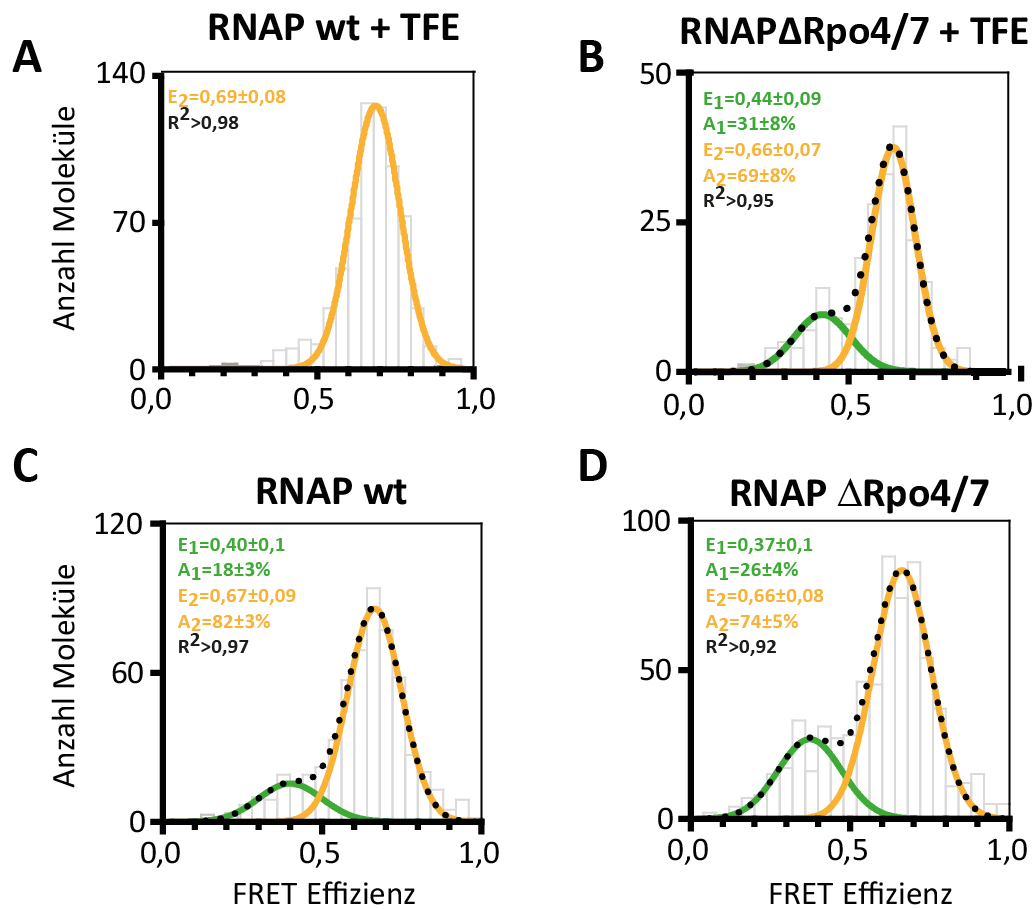


**Abbildung 4.8.1:** FRET-Effizienz-Histogramme der dreifach markierten RNAP mit unterschiedlicher Untereinheitenzusammensetzung. Gezeigt sind RNAPs bestehend aus (A) 10 Untereinheiten, (B) allen 12 Untereinheiten, (C) 9 Untereinheiten und (D) 9 Untereinheiten in Anwesenheit von Rpo4/7, welche ohne die Untereinheit Rpo6 nicht in die RNAP eingebaut werden können. Die Klassenbreite der Histogramme beträgt 0,04 (übernommen und verändert nach [100]).

Die Transkriptionsfaktoren TFE und Spt4/5 können auch mit der freien RNAP assoziieren [22, 43]. Der Einfluss des Transkriptionsfaktors TFE auf die RNAP Clamp wurde getestet, indem TFE (Endkonzentration: 2  $\mu$ M) mit der dreifach markierten RNAP für 10 min bei 65°C inkubiert wurde. Das Histogramm in Abbildung 4.8.2 (A) weist ein definiertes Maximum bei einer FRET-Effizienz von  $E=0,69 \pm 0,08$  auf. Das Anbinden von



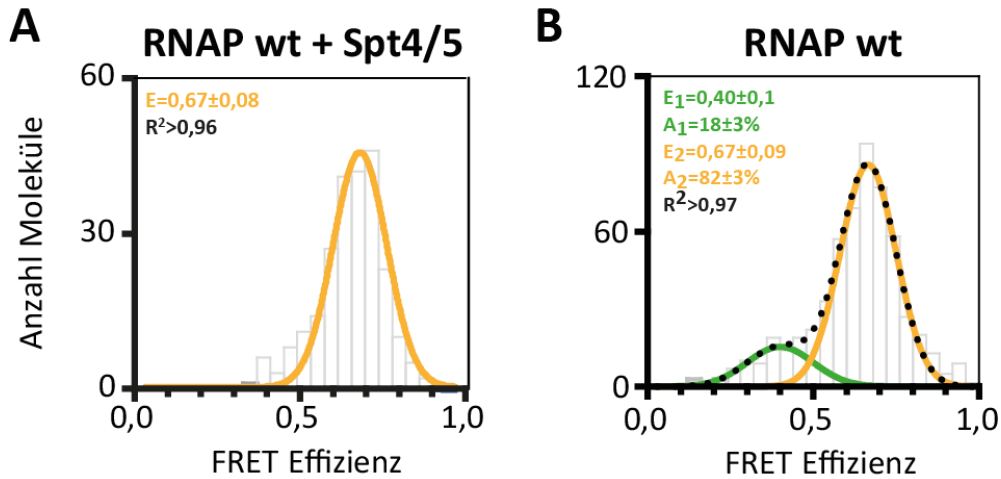
TFE an die RNAP ist abhängig von Rpo4/7. Fehlt diese Domäne, so kann TFE nicht mehr an die RNAP assoziieren und die FRET-Effizienz-Verteilung änderte sich im Vergleich zu RNAP  $\Delta$ Rpo4/7 nicht (s. Abbildung 4.8.2 (B)). Zum Vergleich sind die Histogramme jeweils ohne TFE gezeigt (s. Abbildung 4.8.2 (C), (D)). Da der Elongationsfaktor Spt4/5 eine Anbindungsstelle an der Spitze der Clamp besitzt, wurde dessen Einfluss auf die Position der Clamp untersucht, indem Spt4/5 (Endkonzentration: 40  $\mu$ M) zur dreifach markierten RNAP Wildtyp gegeben und für 10 min bei 65°C inkubiert wurde.



**Abbildung 4.8.2:** FRET-Effizienz-Histogramme der dreifach markierten RNAP mit TFE. Gezeigt sind RNAPs bestehend aus (A) 12 Untereinheiten und (B) 10 Untereinheiten jeweils in Anwesenheit von 2  $\mu$ M TFE. Die Assoziation von TFE an die RNAP ist abhängig von den RNAP Untereinheiten Rpo4/7. (C) FRET-Effizienz-Histogramm der dreifach markierten RNAP Wildtyp und (D) RNAP  $\Delta$ Rpo4/7 in Abwesenheit von TFE. Die Klassenbreite der Histogramme beträgt 0,04.

Wie bei Zugabe von TFE, existierte eine definierte einzelne Population bei einer FRET-Effizienz von  $E = 0,67 \pm 0,08$  (s. Abbildung 4.8.3 (A)). Zum Vergleich ist das Histogramm der dreifach markierten RNAP Wildtyp ohne Spt4/5 gezeigt (s. Abbildung 4.8.3 (B)).

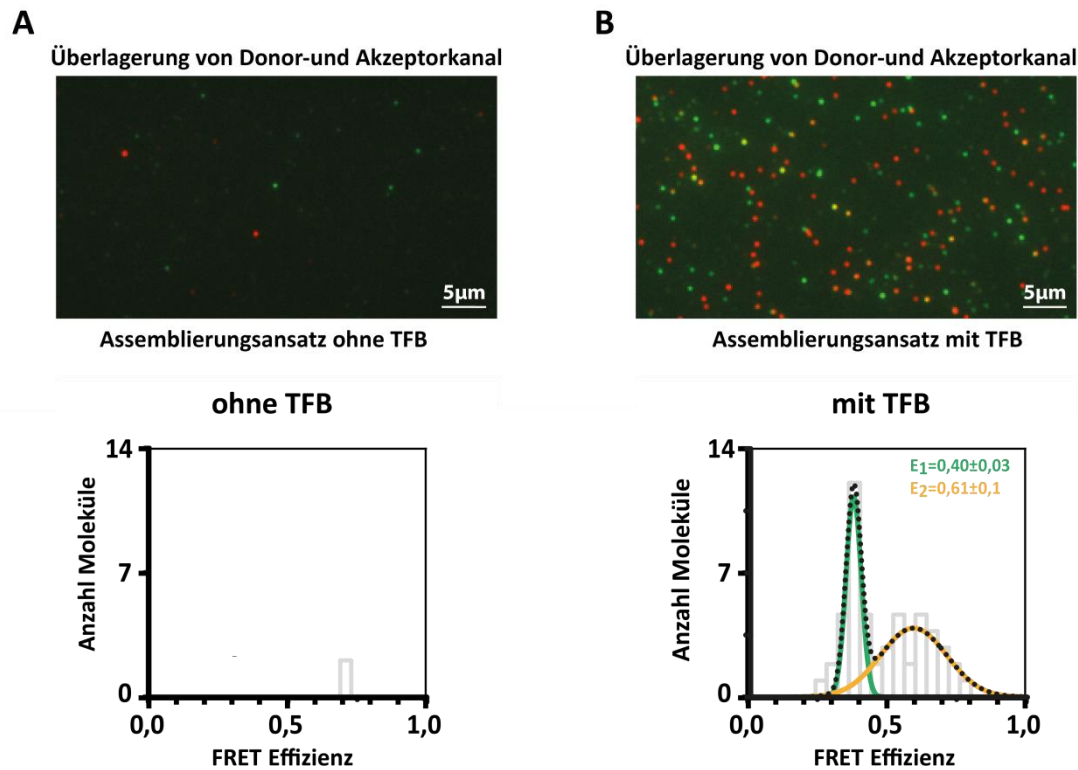




**Abbildung 4.8.3:** FRET-Effizienz-Histogramm der dreifach markierten RNAP in (A) An- und (B) Abwesenheit von 40  $\mu$ M Spt4/5. Die Klassenbreite der Histogramme beträgt 0,04.

## 4.9 Konformation der RNAP Clamp im Prä-Initiationskomplex

In diesem Unterkapitel werden die Ergebnisse über die Position der RNAP Clamp im Prä-Initiationskomplex, der aus doppelsträngiger Promoter-DNA, den zwei Transkriptionsfaktoren TBP, TFB und der RNAP besteht, gezeigt. Die Immobilisierung des Prä-Initiationskomplexes auf der PEG-Oberfläche erfolgte über ein Biotin am nicht-kodogenen Strang der Promoter-DNA. Die Rekrutierung der RNAP zur DNA ist abhängig von TFB [49]. Wurde TFB nicht dem Ansatz zur Assemblierung des Prä-Initiationskomplexes zugesetzt, so waren nur wenige RNAP-Moleküle zu detektieren, deren FRET-Effizienz bestimmt werden konnte (s. Abbildung 4.9.1). Die Zugabe von TFB zum Assemblierungsansatz resultierte in einer höheren Anzahl an Molekülen und die FRET-Effizienzen aus den ersten sechs aufgenommenen Videos konnten in einem Histogramm dargestellt und mit zwei Gaußfunktionen angepasst werden. Zunächst wurde die Konformation der RNAP Wildtyp Clamp im geschlossenen PIK (Homoduplex-DNA, s. Abbildung 4.9.2) gemessen. Das Histogramm zeigt zwei Populationen mit FRET-Werten  $E_1 = 0,40 \pm 0,05$  und  $E_2 = 0,63 \pm 0,12$  (s. Abbildung 4.9.3 (A)) wobei der Hauptteil der Moleküle mit einem Anteil von  $87 \pm 3\%$  detektiert wurde. Im offenen PIK (Heteroduplex-DNA, s. Abbildung 4.9.3 (B)) befanden sich ebenfalls zwei Populationen mit  $E_1 = 0,43 \pm 0,06$  und  $E_2 = 0,62 \pm 0,12$ , die mit einem Doppelgaußfit angepasst werden konnten. Im Gegensatz zum PIK, der mit Homoduplex-DNA assembliert wurde, verringerte sich der Anteil der Population bei  $E_2 = 0,62$  auf  $44\% \pm 2\%$ .



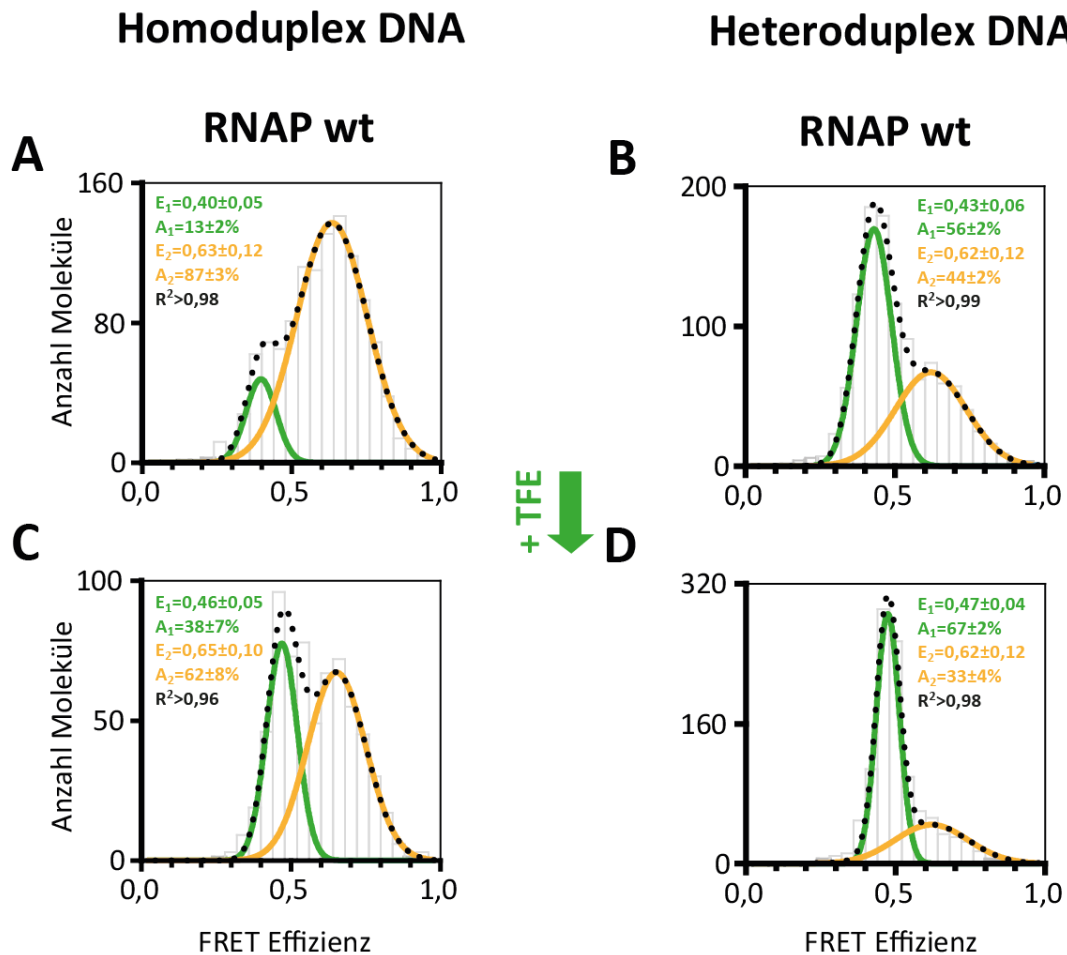
**Abbildung 4.9.1:** Überlagerung des Donor- und Akzeptorkanals der Kamera. Die Spots sind hinsichtlich ihres Detektionskanals eingefärbt. Im Prä-Initiationskomplex, **(A)** der ohne TFB gebildet wurde, kann die RNAP nicht rekrutiert werden, was in einer geringen Molekülzahl resultierte. Gezeigt ist das Histogramm der FRET-Spuren, die aus sechs Videos stammen. **(B)** Ist TFB Bestandteil des Prä-Initiationskomplexes, der mit einer Heteroduplex DNA gebildet wurde, so konnten doppelt markierte Moleküle (gelb) detektiert werden. Insgesamt sind 53 FRET-Spuren aus sechs aufgenommenen Videos in einem Histogramm dargestellt.

<b>Homoduplex DNA</b>			
nicht-kodogener Strang	5' - . . . TATATAGATAGAGTATAAGCGG	+1	AGGGTTGAG . . . -3'
kodogener Strang	3' - . . . ATATATCTATCTCATATTCGCC		TCCCAACTC . . . -5'
<b>Heteroduplex DNA</b>			
nicht-kodogener Strang	5' - . . . TATATAGATAGAGTATA	GATA +1	GAGGGTTGAG . . . -3'
kodogener Strang	3' - . . . ATATATCTATCTCATAT	TCGC	CTCCCAACTC . . . -5'

**Abbildung 4.9.2:** DNA-Sequenzen der Homo- und Heteroduplex Promoter-DNA. Der Transkriptionsstartpunkt ist mit jeweils (+1) gekennzeichnet und die DNA-Fehlpaarung in der Heteroduplex DNA ist rot markiert.

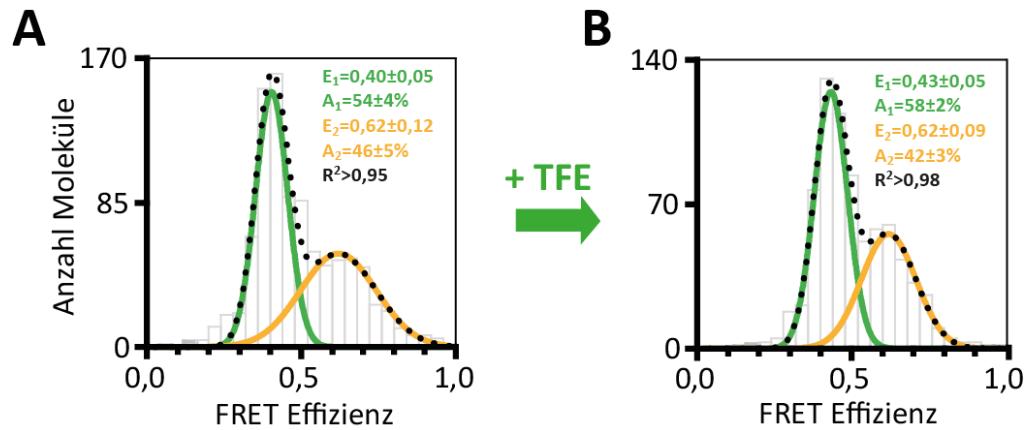
Bei Zugabe des Transkriptionsfaktors TFE blieben die zwei Populationen bestehen (Homoduplex-DNA:  $E_1 = 0,46 \pm 0,05$ ,  $E_2 = 0,65 \pm 0,10$ , Heteroduplex-DNA:  $E_1 = 0,47 \pm 0,04$ ,  $E_2 = 0,62 \pm 0,12$ ), jedoch änderte sich deren Verteilung (s. Abbildung 4.9.3 (C) und (D)).

Die Populationen mit hoher FRET-Effizienz verringerten sich um 25% für die Homoduplex- und um 11% für die Heteroduplex-DNA. Die Zugabe von TFE zum PIK, der mit der RNAP $\Delta$ Rpo4/7 gebildet wurde, führte zu keiner signifikanten Änderung der mittleren FRET-Effizienzen ( $E_1=0,43 \pm 0,05$ ,  $E_2=0,62 \pm 0,09$ ) und Verteilung der Populationen ( $A_1=58 \pm 2\%$ ,  $A_2=42 \pm 3\%$ ) im Vergleich zum Prä-Initiationskomplex, der kein TFE enthielt (s. Abbildung 4.9.4).



**Abbildung 4.9.3:** FRET-Effizienz-Histogramme der doppelt markierten RNAP Wildtyp im Prä-Initiationskomplex, der mit einer Homoduplex-DNA in (A) Abwesenheit und (C) Anwesenheit von 2  $\mu$ M TFE gebildet wurde und der mit einer Heteroduplex-DNA in (B) Abwesenheit und (D) Anwesenheit von 2  $\mu$ M TFE gebildet wurde. Die Klassenbreite der Histogramme beträgt 0,04 (übernommen und verändert nach [100]).

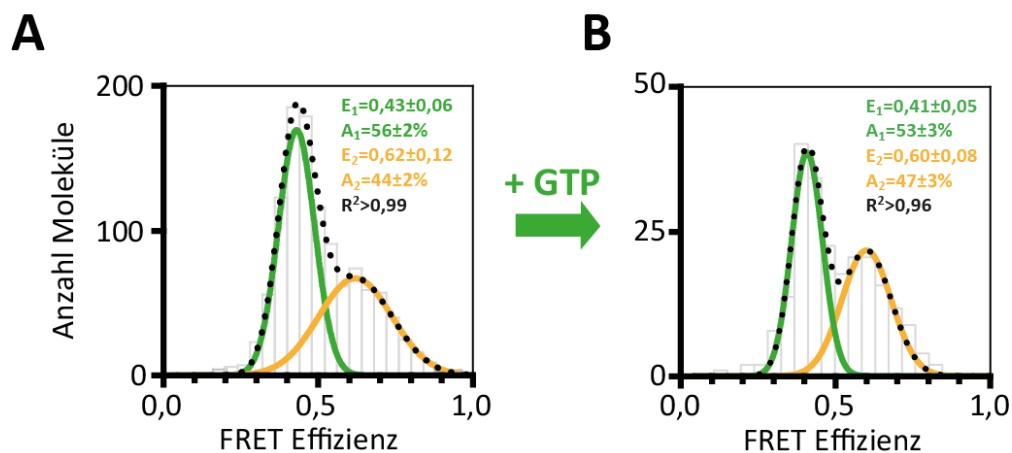
## Heteroduplex DNA RNAP $\Delta$ Rpo4/7



**Abbildung 4.9.4:** FRET-Effizienz-Histogramme der doppelt markierten RNAP $\Delta$ Rpo4/7 im Prä-Initiationskomplex, der mit der Heteroduplex-DNA in **(A)** Ab- und **(B)** Anwesenheit von 2  $\mu$ M TFE gebildet wurde. TFE kann bei fehlenden RNAP Untereinheiten Rpo4/7 nicht an die RNAP assoziieren. Die Klassenbreite der Histogramme beträgt 0,04 (übernommen und verändert nach [100]).

Der Einfluss des darauffolgenden korrekten Nukleotids (GTP) wurde getestet, indem 750  $\mu$ M GTP zum Assemblierungsansatz des offenen Prä-Initiationskomplexes hinzugefügt und bei 65°C für 5 min inkubiert wurde. Dies führte zu keiner signifikanten Änderung der FRET-Effizienzen ( $E_1 = 0,41 \pm 0,05$ ,  $E_2 = 0,60 \pm 0,08$ ) oder der Verteilung der Populationen ( $A_1 = 53 \pm 3\%$ ,  $A_2 = 47 \pm 3\%$ ) (s. Abbildung 4.9.5).

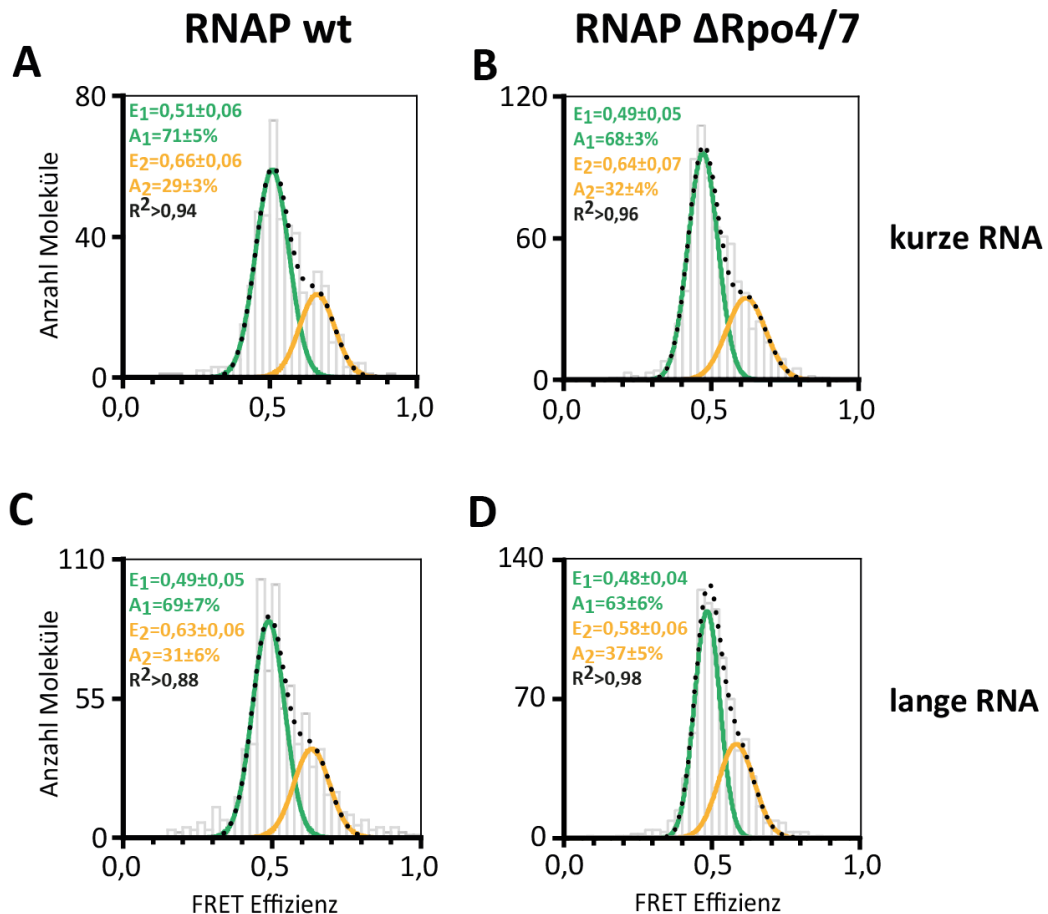
## Heteroduplex DNA RNAP wt



**Abbildung 4.9.5:** FRET-Effizienz-Histogramm der doppelt markierten RNAP Wildtyp im Prä-Initiationskomplex **(A)** vor und **(B)** nach Inkubation des Nukleotids GTP (Endkonzentration: 750  $\mu$ M). Die Klassenbreite des Histogramms beträgt 0,04.

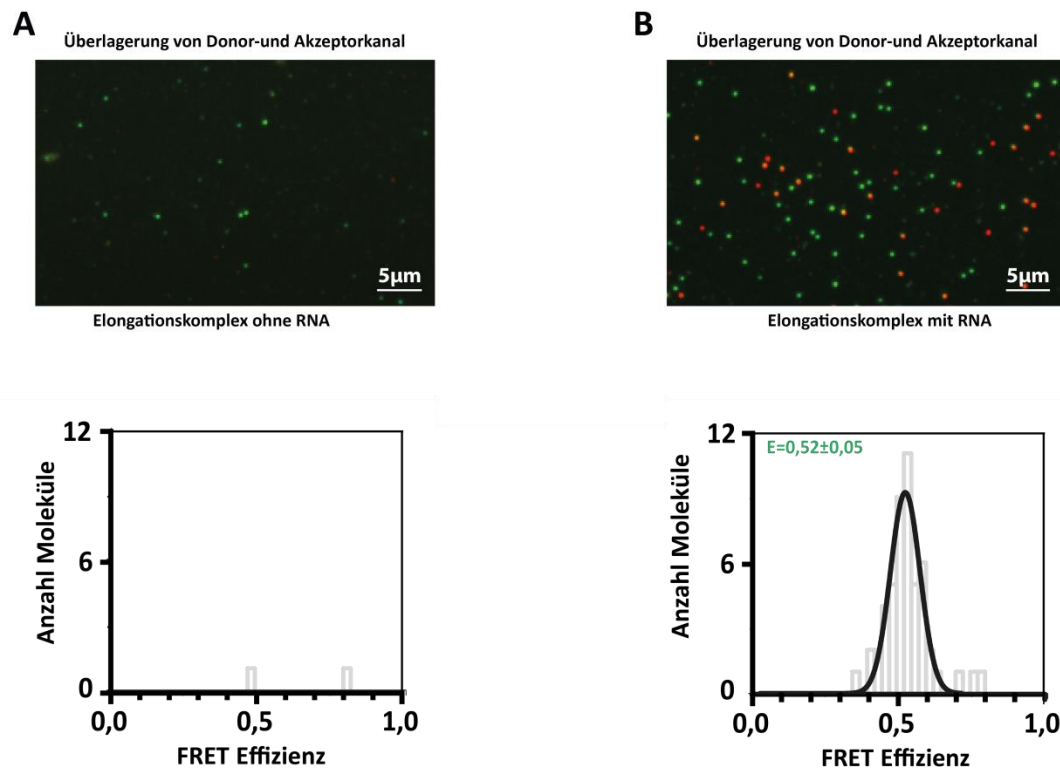
## 4.10 Konformation der RNAP Clamp im Elongationskomplex

Die Konformation der RNAP Clamp im Elongationskomplex wurde für RNAP $\Delta$ Rpo4/7 und für RNAP wt gemessen (s. Abbildung 4.10.1). Die spezifische Rekrutierung der RNAP auf den Elongationscaffold war zwingend abhängig von der Anwesenheit der RNA. Fehlte diese im Elongationsansatz, so konnte kein Elongationskomplex gebildet werden und es waren nur wenige RNAP-Moleküle zu detektieren, deren FRET-Effizienz bestimmt werden konnte (s. Abbildung 4.10.2). Somit sind diese detektierten Moleküle auf unspezifische Wechselwirkung mit der Oberfläche zurückzuführen. Wurde die RNA dem Elongationsassemblierungsansatz hinzugefügt, so resultierte dies in einer höheren Anzahl an Molekülen. Es wurden jeweils aus den ersten fünf aufgenommenen Videos die FRET-Effizienzen in einem Histogramm dargestellt.



**Abbildung 4.10.1:** FRET-Effizienz-Histogramme der doppelt markierten RNAP bestehend aus 12- und 10 Untereinheiten im Elongationskomplex, der mit einer (A), (B) 14 nt-langen RNA und mit einer (C), (D) 35 nt-langen RNA gebildet wurde. Die Klassenbreite der Histogramme beträgt 0,025.

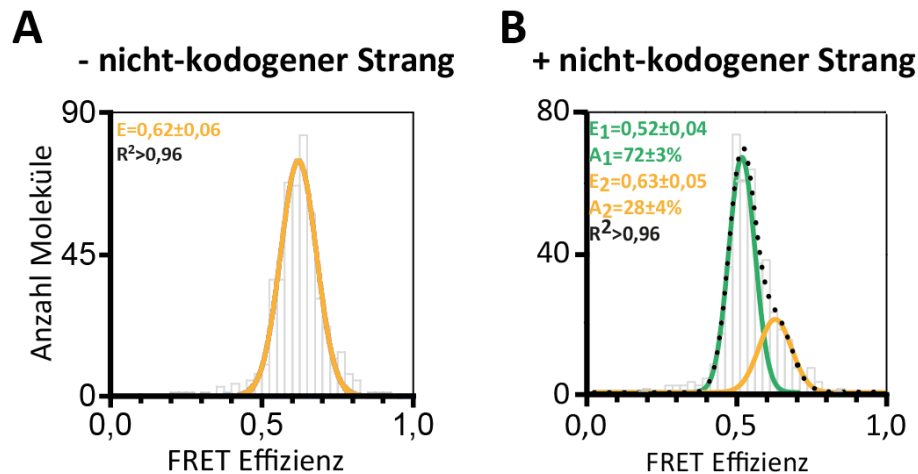
In erfolgreich assemblierten Elongationsansätzen konnten zwei Populationen für die doppelt markierten Polymerasen detektiert werden:  $E_1=0,51 \pm 0,06$ ,  $E_2=0,66 \pm 0,06$  ( $A_1=71 \pm 5\%$ ,  $A_2=29 \pm 3\%$ ) für RNAP Wildtyp und  $E_1=0,49 \pm 0,05$ ,  $E_2=0,64 \pm 0,07$  ( $A_1=68 \pm 3\%$ ,  $A_2=32 \pm 4\%$ ) für RNAP $\Delta$ Rpo4/7. Die neu gebildete RNA kann, wenn sie eine Länge von 26 - 29 Nukleotiden erreicht, mit den Untereinheiten Rpo4/7 interagieren [37, 70]. Daher wurde zusätzlich eine RNA bestehend aus insgesamt 35 Nukleotiden verwendet, um den Einfluss der Wechselwirkung zwischen RNA und Rpo4/7 auf die Konformation der Clamp zu untersuchen.



**Abbildung 4.10.2:** Überlagerung des Donor- und Akzeptorkanals der Kamera. Die Spots sind hinsichtlich ihrer Detektion eingefärbt. Im Elongationskomplex, der (A) ohne RNA gebildet wurde, kann die RNAP nicht rekrutiert werden, was in einer geringen Molekülzahl auf der Oberfläche sowie wenigen FRET-Spuren resultiert. Die FRET-Effizienzen aus fünf aufgenommenen Videos wurden in einem Histogramm dargestellt. (B) Ist die RNA im Elongationskomplex vorhanden, so können doppelt markierte Moleküle (gelb) detektiert werden. Gezeigt ist das Histogramm der FRET-Effizienzen aus jeweils fünf aufgenommenen Videos. Als Probe wurde die doppelt markierte RNAP Wildtyp im Elongationskomplex nach Zugabe des richtigen Nukleotids verwendet.

Das Histogramm (s. Abbildung 4.10.1 (C)) zeigt zwei Populationen bei  $E_1=0,49 \pm 0,05$  ( $A_1=69 \pm 7\%$ ) und  $E_2=0,63 \pm 0,06$  ( $A_2=31 \pm 6\%$ ) für RNAP Wildtyp, die sich im Vergleich zur RNA mit 14 Nukleotiden, nicht unterscheidet. Zur Vervollständigung des Experiments wurde die doppelt markierte RNAP $\Delta$ Rpo4/7 ebenfalls im Elongationskomplex

mit der 35 nt-langen RNA gemessen, deren FRET-Effizienzen ( $E_1=0,48 \pm 0,04$ ,  $E_2=0,58 \pm 0,06$ ) und Verteilung der Populationen ( $A_1=63 \pm 6\%$ ,  $A_2=37 \pm 5\%$ ) sich nicht signifikant von der doppelt markierten RNAP Wildtyp unterscheidet (s. Abbildung 4.10.1 (D)). Im nächsten Experiment wurde der nicht-kodogene Strang aus dem Elongationsansatz entfernt, sodass die RNAP Wildtyp nur noch an das Hybrid, bestehend aus kodogenem Strang und RNA, assoziieren kann. Es wurde gezeigt, dass die archaeelle RNAP eine Kombination aus kodogenem-Strang und RNA für die Transkription verwenden kann und durch das Hinzufügen des nicht-kodogenen Strangs die Prozessivität der RNAP erhöht wird [38]. Das Histogramm der doppelt markierten RNAP zeigt eine definierte Population bei  $E=0,62 \pm 0,06$ . Wurde nachträglich der nicht-kodogene Strang hinzugefügt, so wurde die Population bei  $E_1=0,52 \pm 0,04$  ( $A_1=72 \pm 3\%$ ) wiederhergestellt, wobei sich in der Population mit einer FRET-Effizienz von  $E_2=0,63 \pm 0,05$  noch ein Anteil der Moleküle befindet ( $28 \pm 4\%$ ) (s. Abbildung 4.10.3).

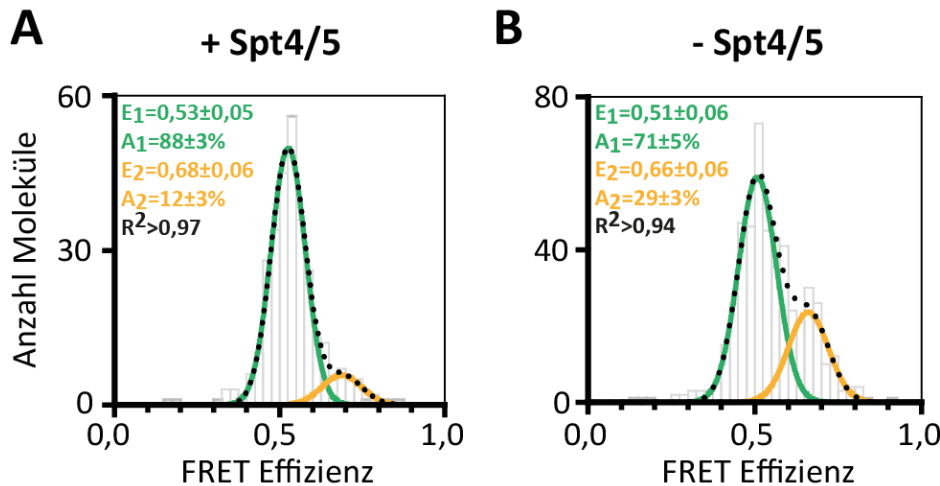


**Abbildung 4.10.3:** FRET-Effizienz-Histogramme der RNAP Wildtyp im Elongationskomplex **(A)** in Abwesenheit des nicht-kodogenen Strangs und **(B)** in Anwesenheit des nicht-kodogenen Strangs, der nachträglich zum Elongationskomplex hinzugefügt wurde. Die Komplexe wurden in beiden Fällen über ein Biotin am kodogenen Strang auf der Oberfläche immobilisiert. Die Klassenbreite der Histogramme beträgt 0,025.

Die Zugabe des Elongationsfaktors Spt4/5 zum Elongationskomplex (s. Abbildung 4.10.4 (A)) resultierte in zwei Populationen mit FRET-Effizienzen bei  $E_1=0,53 \pm 0,05$  und  $E_2=0,68 \pm 0,06$ , wobei die Population bei  $E_2$  nur  $12\% \pm 3\%$  beträgt. Insgesamt reduziert sich die Population bei  $E_2$  im Vergleich zur doppelt markierten RNAP im Elongationskomplex ohne Spt4/5 um 17% (s. Abbildung 4.10.4 (B)). Als Nächstes wurde die Veränderung der FRET-Effizienzen und Populationen der RNAP Clamp bei Zugabe unterschiedlicher Nukleotide zum Elongationskomplex untersucht. Als Ver-



gleichsmessung diene dabei die Messung mit RNAP Wildtyp ohne Nukleotid. Zunächst wurde der Elongationskomplex geformt und nach abgeschlossener Inkubation mit Heparin wurde dem Assemblierungsansatz entweder das darauffolgende richtige Nukleotid (UTP oder ATP, variierte je nach RNA-Sequenz), das falsche Nukleotid (ATP) oder das nicht-hydrolysierbare Nukleotid-Analogon Adenosin-5'-[( $\alpha$ ,  $\beta$ )-methyleno]Triphosphat (AMPcPP, s. Abbildung 4.10.5) dazugegeben und für weitere 5 min bei 65°C inkubiert.

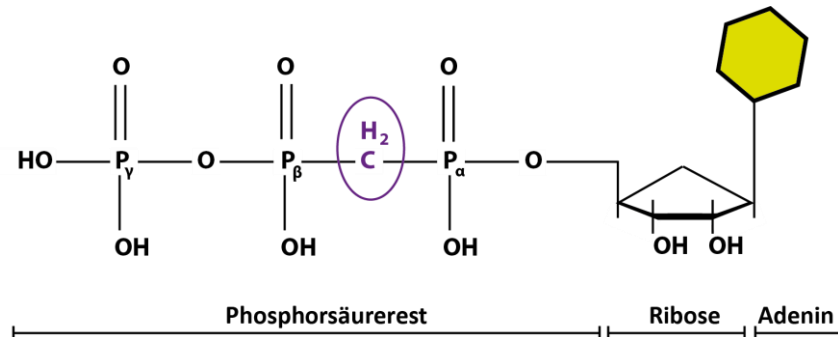


**Abbildung 4.10.4:** FRET-Effizienz-Histogramm der doppelt markierten RNAP Wildtyp im Elongationskomplex **(A)** in Anwesenheit des Elongationsfaktors Spt4/5 (40  $\mu$ M) und **(B)** in Abwesenheit von Spt4/5. Die Klassenbreite der Histogramme beträgt 0,025.

Die Endkonzentrationen der Nukleotide im Ansatz betrugen jeweils 750  $\mu$ M. Für diese Experimente wurden insgesamt drei unterschiedliche RNA-Sequenzen verwendet (s. 3.3), entweder ein langer RNA-Strang (35 Nukleotide) oder einer von zwei kurzen RNA-Strang-Varianten (jeweils 14 Nukleotide) (s. Abbildung 4.10.6). Die Zugabe des richtigen Nukleotids (UTP für RNA T40) resultierte in einer großen Hauptpopulation bei  $E_1 = 0,49 \pm 0,04$  ( $80 \pm 4\%$ ) und einer kleineren Nebenpopulation bei  $E_2 = 0,60 \pm 0,06$  ( $20 \pm 3\%$ ) (s. Abbildung 4.10.7 (B)). Die Population bei FRET-Wert  $E_2$  nahm somit um 9%, im Vergleich zur Messung ohne UTP, ab (s. Abbildung 4.10.7 (A)). Enthielt das DNA/RNA-Hybrid die lange RNA und wurde das richtige Nukleotid (UTP) zugegeben, so verringerte sich die zweite Population bei  $E_2 = 0,62 \pm 0,06$  auf  $14 \pm 4\%$  (s. Abbildung 4.10.7 (C)). Inkubation des Elongationskomplexes mit dem falschen Nukleotid (ATP) führte zu keiner signifikanten Veränderung der Verteilung der Populationen mit den FRET-Effizienzen  $E_1 = 0,50 \pm 0,06$  ( $72 \pm 7\%$ ) und  $E_2 = 0,62 \pm 0,06$  ( $28 \pm 6\%$ ) (s. Abbildung 4.10.7 (D)) im Vergleich zur Messung ohne Nukleotid. Wird der Elongationskomplex mit einem DNA/RNA-Hybrid gebildet, das die RNA T43 enthält und das richtige Nukleo-



tid (ATP) zugegeben, führte dies ebenfalls zu einer Verringerung der  $E_2$ -Population um 15 % ( $E_1=0,48 \pm 0,05$  ( $86 \pm 4\%$ );  $E_2=0,62 \pm 0,06$  ( $14 \pm 3\%$ )) (s. Abbildung 4.10.7 (E)).

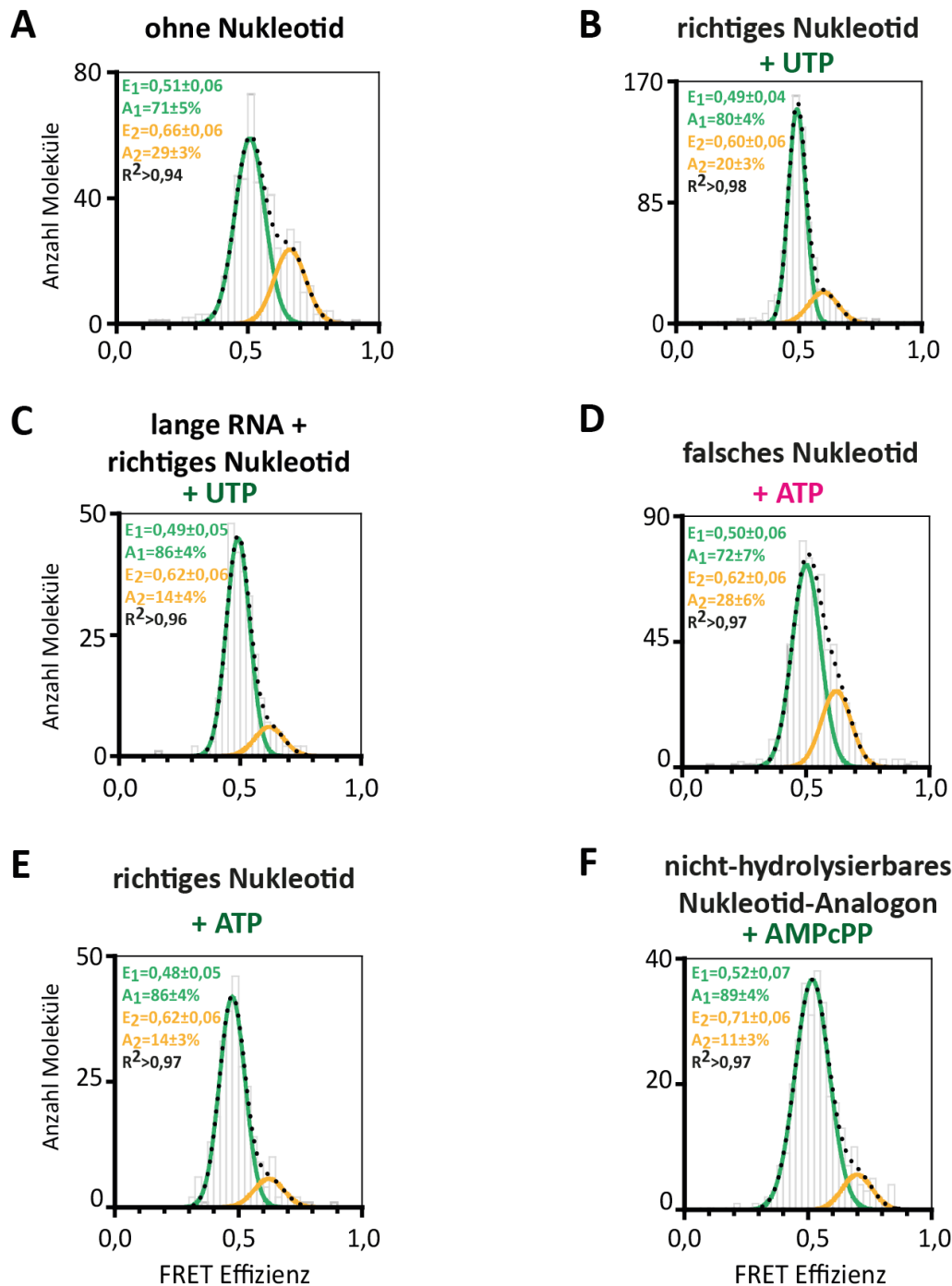


**Abbildung 4.10.5:** Schematische Darstellung des nicht-hydrolysierbaren Nukleotid-Analogons Adenosin-5'-[( $\alpha$ ,  $\beta$ )-methylene]Triphosphat. Durch die Alkylgruppe  $\text{CH}_2$  (lila) wird das Abspalten des Pyrophosphats bei der RNA Polymerisation verhindert.

nicht-kodogener Strang	5' - CCGGCAGTACTAGTAATGACCAGGCGTAACTACTTCAT . . . - 3'
RNA T40	AUUUA GACCAGGCG + UTP / + ATP
RNA T43	UUUAC ACCAGGCGU + ATP / + AMPcPP
RNA lang	AACA UUA CACGAAUUAUUAUGAUUUAGACCAGGCG + UTP
kodogener Strang	3' - GGCCGTCATGATCATTTACTGGTCCGCATTGATGAAGTA . . . - 5'

**Abbildung 4.10.6:** Die drei unterschiedlichen RNA Sequenzen und die Teilsequenz des kodogenen/nicht-kodogenen Strangs sind dargestellt. RNA T40 und T43 bestehen jeweils aus 14 Nukleotiden, dessen Sequenz aber um ein Nukleotid verschoben ist. Die lange RNA besteht aus 35 Nukleotiden. Die dunkelgrüne Sequenz der RNA ist komplementär zum kodogenen Strang, während die hellgrüne Sequenz nicht mit dem kodogenen Strang hybridisieren kann. Das jeweils darauffolgende richtige (dunkelgrün) und falsche (pink) Nukleotid sind jeweils für die unterschiedlichen RNA Sequenzen eingezeichnet.

Ein nicht-hydrolysierbares Nukleotid-Analogon enthält eine zusätzliche Alkylgruppe  $\text{CH}_2$  (s. Abbildung 4.10.5), sodass das Nukleotid zwar von der RNAP in der Nukleotid-Bindetasche positioniert, aber das Pyrophosphat nicht abgespalten werden kann und keine Verlängerung der wachsenden RNA möglich ist. Bei Verwendung von AMPcPP ergab sich eine Hauptpopulation bei  $E_1=0,52 \pm 0,07$  ( $A_1=89 \pm 4\%$ ) und einer Population mit verhältnismäßig geringem Anteil an Molekülen bei  $E_2=0,71 \pm 0,06$  ( $A_2=11 \pm 3\%$ ) (s. Abbildung 4.10.7 (F)). Die Zugabe des richtigen Nukleotids bzw. des nicht-hydrolysierbaren Nukleotid-Analogons AMPcPPs verschob also nahezu komplett das Gleichgewicht in Richtung der Population mit geringerer FRET-Effizienz, während bei Zugabe des falschen Nukleotids keine signifikante Änderung messbar war. Die Messungen mit der RNAP $\Delta$ Rpo4/7-Variante befinden sich im Anhang C.

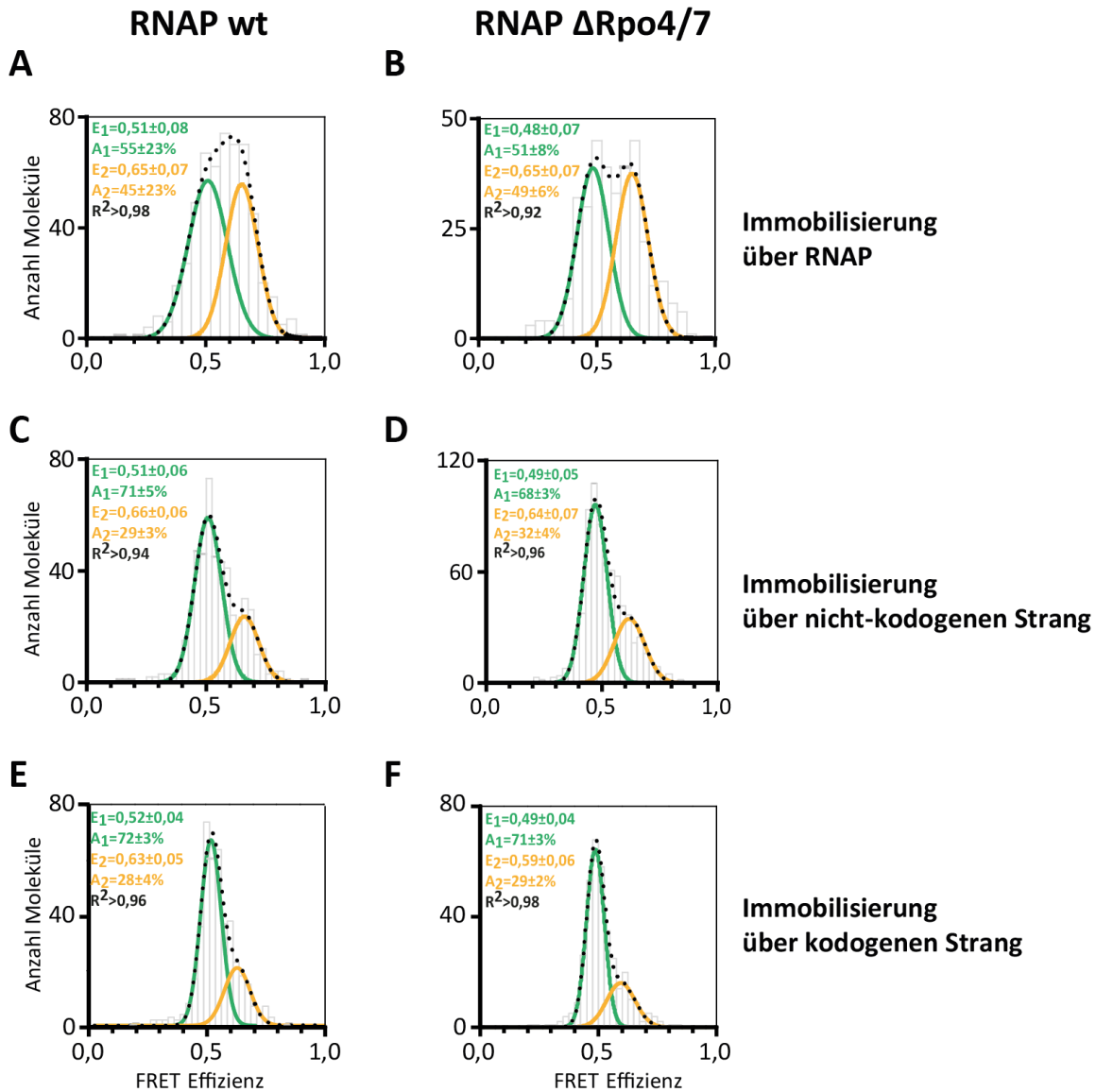


**Abbildung 4.10.7:** FRET-Effizienz-Histogramme der doppelt markierten RNAP Wildtyp im Elongationskomplex und in Anwesenheit des **(A)**, **(B)**, **(D)** richtigen Nukleotids (UTP, ATP), des **(C)** falschen Nukleotids (ATP) und **(E)** eines nicht-hydrolysierbaren Nukleotid-Analogons Adenosin-5'-[( $\alpha$ ,  $\beta$ )-methyleno]Triphosphat (übernommen und verändert nach [100]).

## 4.11 Kontrollexperimente

### 4.11.1 Einfluss der Immobilisationsstrategie auf die mittleren FRET-Effizienzen

Die Zugabe des dsDNA/RNA-Hybrids zur dreifach markierten RNAP, das zur Bildung des Elongationskomplexes (Präparation s. Kapitel 3.4), führt, resultierte in einer Verschiebung der FRET-Effizienzen  $E_1=0,51 \pm 0,08$ ,  $E_2=0,65 \pm 0,07$  für RNAP Wildtyp (s. Abbildung 4.11.1 (A)) und  $E_1=0,48 \pm 0,07$ ,  $E_2=0,65 \pm 0,07$  für RNAP  $\Delta Rpo4/7$  (s. Abbildung 4.11.1. (B)). Das Histogramm der doppelt markierten RNAP Wildtyp im Elongationskomplex, das über den nicht-kodogenen Strang immobilisiert wurde ( $E_1=0,51 \pm 0,06$ ,  $E_2=0,66 \pm 0,06$ , s. Abbildung 4.11.1 (C)), zeigt im Vergleich zum Histogramm der doppelt markierten RNAP Wildtyp im Elongationskomplex, das über den kodogenen Strang auf die Oberfläche immobilisiert wurde ( $E_1=0,52 \pm 0,04$ ,  $E_2=0,63 \pm 0,05$ , s. Abbildung 4.11.1 (E)), keine signifikante Änderung der FRET-Effizienzen. Ähnliche Ergebnisse wurden für die doppelt markierte RNAP  $\Delta Rpo4/7$  erhalten. Das Histogramm der doppelt markierten RNAP  $\Delta Rpo4/7$  im Elongationskomplex, das über den nicht-kodogenen Strang immobilisiert wurde ( $E_1=0,50 \pm 0,05$ ,  $E_2=0,64 \pm 0,07$ , s. Abbildung 4.11.1 (D)), zeigt im Vergleich zum Histogramm der doppelt markierten RNAP  $\Delta Rpo4/7$  im Elongationskomplex, das über den kodogenen Strang auf die Oberfläche immobilisiert wurde ( $E_1=0,49 \pm 0,04$ ,  $E_2=0,59 \pm 0,06$ , s. Abbildung 4.11.1 (F)), keine signifikante Änderung der FRET-Effizienzen.

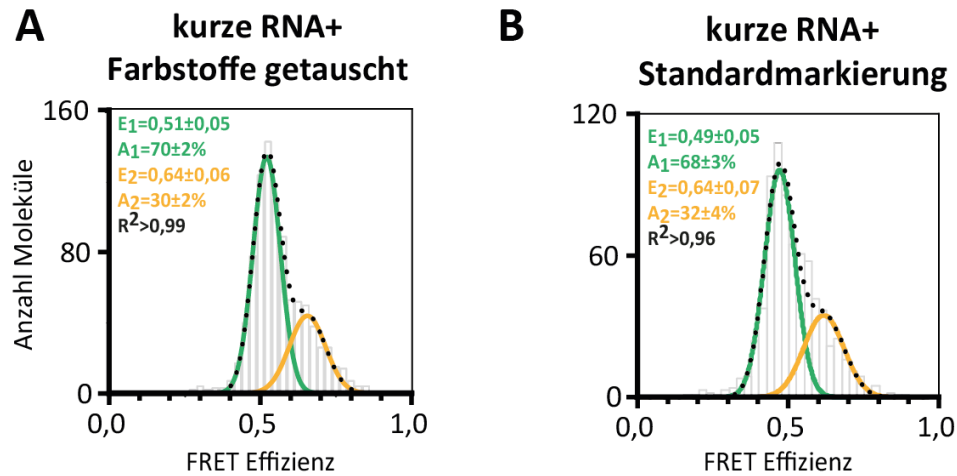


**Abbildung 4.11.1:** FRET-Effizienz-Histogramme von Elongationskomplexen, welche (A), (B) die dreifach markierte RNAP und (C), (D), (E), (F) die doppelt markierte RNAP enthalten. Die Komplexe wurden entweder über das Biotin in der RNAP Untereinheit Rpo11, dem Biotin im nicht-kodogenen Strang oder im kodogenen Strang immobilisiert. In allen Fällen wurden zwei Populationen gemessen, deren mittlere FRET-Effizienzen unabhängig von der Wahl der Immobilisierung sind (übernommen und verändert aus [100]).

#### 4.11.2 Einfluss der Wahl der Positionen der Farbstoffe

Für eine weitere Kontrollmessung, um den Einfluss der Farbstoffe an den Positionen auszuschließen, wurde eine RNAP assembliert, bei welcher die Positionen der Farbstoffe getauscht wurden. Die FRET-Effizienzen  $E_1 = 0,51 \pm 0,05$  ( $A_1 = 70 \pm 2\%$ ) und  $E_2 = 0,64 \pm 0,06$  ( $A_2 = 30 \pm 2\%$ ) sowie die Populationen änderten sich nicht signifikant im Vergleich zu der doppelt markierten RNAP  $\Delta Rpo4/7$  mit den Standardpositionen der Farbstoffe ( $E_1 = 0,49 \pm 0,05$ ,  $A_1 = 68 \pm 3\%$  und  $E_2 = 0,64 \pm 0,07$ ,  $A_2 = 32 \pm 4\%$ ), sodass ein

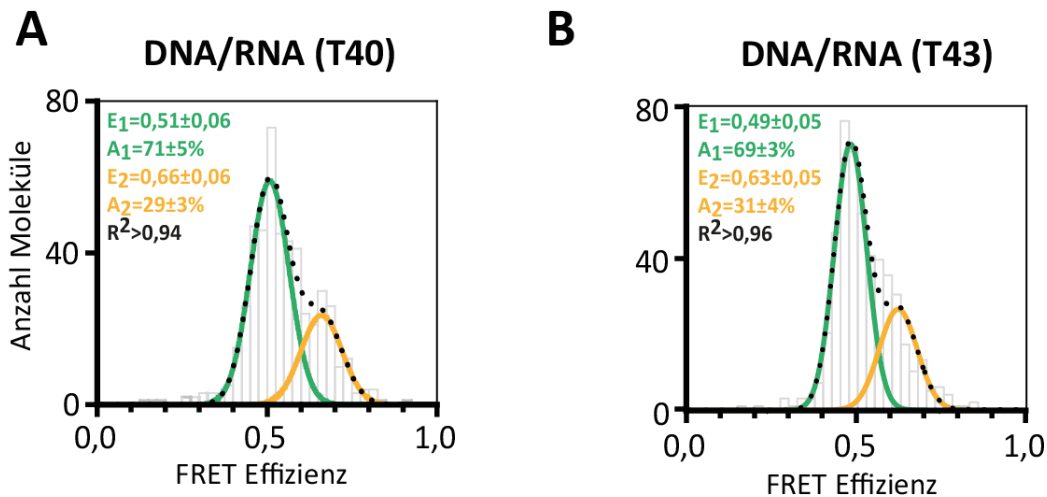
verfälschender Einfluss der Fluorophore ausgeschlossen werden konnte (s. Abbildung 4.11.2).



**Abbildung 4.11.2:** FRET-Effizienz-Histogramme der doppelt markierten **(A)** RNAP $\Delta$ Rpo4/7\_Rpo1<sup>E257\*DL650</sup>\_Rpo2<sup>Q373\*DL550</sup> (Farbstoffpositionen getauscht) und **(B)** der doppelt markierten RNAP $\Delta$ Rpo4/7\_Rpo1<sup>E257\*DL550</sup>\_Rpo2<sup>Q373\*DL650</sup> (Standardpositionen der Farbstoffe) im Elongationskomplex. Die Wahl der Farbstoffpositionierung hat keinen Einfluss auf die mittleren FRET-Effizienzen und die Verteilung der Populationen (übernommen und verändert nach [100]).

### 4.11.3 Einfluss der RNA-Sequenz im Elongationskomplex

Der Einfluss der unterschiedlichen kurzen RNA Sequenzen, die jeweils eine Länge von 14 Nukleotiden haben, auf die Konformation der RNAP Clamp Wildtyp wurde untersucht. Die Sequenz der RNA T43 ist um ein Nukleotid gegenüber der RNA T40-Sequenz verschoben. Die mittleren FRET-Effizienzen ( $E_1 = 0,49 \pm 0,05$ ,  $E_2 = 0,63 \pm 0,05$ ) und die Verteilung der Populationen ( $A_1 = 69 \pm 3\%$ ,  $A_2 = 31 \pm 4\%$ ) der RNAP Clamp im Elongationskomplex, das die RNA T43 beinhaltet, wies keine signifikante Änderung gegenüber der Messung der RNAP Clamp im Elongationskomplex, das die RNA T40 beinhaltet, auf ( $E_1 = 0,51 \pm 0,06$ ,  $A_1 = 71 \pm 5\%$  und  $E_2 = 0,66 \pm 0,06$ ,  $A_2 = 29 \pm 3\%$ , s. Abbildung 4.11.3).

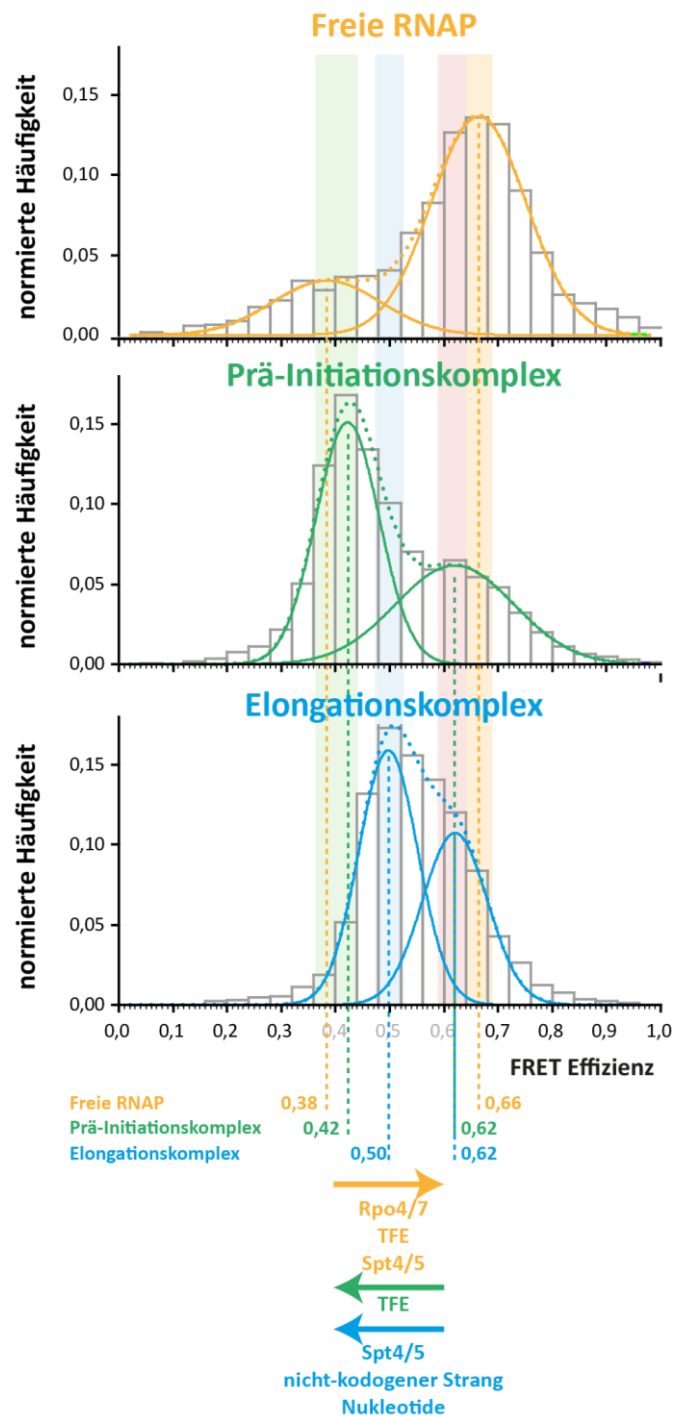


**Abbildung 4.11.3:** FRET-Effizienz-Histogramme der RNAP Wildtyp im Elongationskomplex, das **(A)** die RNA T40 und **(B)** die RNA T43 enthält. Die Klassenbreite der Histogramme beträgt 0,025.

## 4.12 Zusammenfassung der Histogramme

Wurden alle Histogramme der jeweiligen Stufe des Transkriptionszyklus ohne die Transkriptionsfaktoren zusammengefasst (s. Abbildung 4.12.1), so ließen sich insgesamt vier unterschiedliche FRET-Effizienzen (0,38/0,42, 0,50, 0,62 und 0,66) identifizieren, welchen vier unterschiedlichen RNAP Clamp Konformationen zugeordnet werden konnten. Die Clamp der freien RNA Polymerase befand sich vorzugsweise in einem konformationellen Zustand, der in einer Population mit einem FRET-Effizienz-Maximum von  $E=0,66$  (gelber Balken) resultierte. Der prozentuale Anteil der Population bei der höheren FRET-Effizienz wurde durch den Transkriptionsfaktor TFE und den Elongationsfaktor Spt4/5 erhöht. Es befanden sich aber auch einige Moleküle in einer Konformation, die sich in der Population mit dem FRET-Effizienz-Maximum von  $E=0,38$  (grüner Balken) widerspiegelte. Im Prä-Initiationskomplex konnte die RNAP Clamp ebenfalls zwei Konformationen einnehmen, die den Populationen bei den mittleren FRET-Effizienzen  $E=0,42$  und  $E=0,62$  entsprechen. TFE verschob das Gleichgewicht in Richtung der RNAP Clamp Konformation, welcher der Population mit dem FRET-Effizienz-Maximum von  $E=0,42$  (grüner Balken) entspricht. Es existieren zwei konformationelle Zustände der RNAP Clamp im Elongationskomplex, die den zwei Populationen mit den mittleren FRET-Effizienz-Maxima  $E=0,50$  und  $E=0,62$  entsprechen. Die Abwesenheit des nicht-kodogenen Strangs verschob das Gleichgewicht komplett in Richtung des konformationellen Zustandes der RNAP Clamp, welches der Population mit dem FRET-Effizienz-Maximum von  $E=0,62$  (roter Balken) widerspiegelt. Der prozentuale Anteil der Population bei niedrigerer FRET-Effizienz  $E=0,50$  wurde durch die

Anwesenheit des Elongationsfaktors Spt4/5 und durch die Zugabe der Nukleotide erhöht (blauer Balken). Die Zusammenfassung aller Messergebnisse befindet sich im Anhang D.



**Abbildung 4.12.1:** Zusammenfassung aller Histogramme, die zur jeweiligen Phase des Transkriptionszyklus gehören. Dabei wurden nur Daten gewählt, die in Abwesenheit aller Transkriptionsfaktoren und Nukleotide gemessen wurden. Die RNAP Clamp nimmt in einer freien Konfiguration, im Prä-Initiations- und Elongationskomplex jeweils zwei Konformationen ein, die sich in jeweils zwei Populationen widerspiegeln. (übernommen und verändert nach [100]).

## 5 Diskussion

Die Ergebnisse zeigen, dass die Clamp Domäne der RNA Polymerase aus dem archaeellen Organismus *Methanocaldococcus jannaschii* unterschiedliche Konformationen, die abhängig von der Phase im Transkriptionszyklus sind, annimmt. Die RNAP Clamp öffnet und schließt sich in Abhängigkeit von den RNAP Untereinheiten Rpo4/7, dem DNA Schmelzen während der Initiationsphase, dem Anbinden des Initiationsfaktors TFE im Prä-Initiationskomplex, dem Anbinden des Elongationsfaktors Spt4/5 und der Anwesenheit des nicht-kodogenen Strangs im Elongationskomplex und dem Binden des korrekten Nukleotids im aktiven Zentrum der RNAP.

### 5.1 Absolute Abstände

Da die FRET-Rate von der sechsten Potenz des Abstandes zwischen den Fluorophoren abhängt, können kleine Fehler der FRET-Messungen große Auswirkungen auf die absoluten Abstände sowie deren relative Änderungen haben. Um die tatsächlichen Abstände aus den FRET-Effizienzen zu erhalten, müssen die Zeit-Intensitätsspuren aus den Einzelmolekül-FRET-Messungen hinsichtlich des Hintergrundes, des spektralen Übersprechens, der direkten Anregung des Akzeptors durch die Anregungswellenlänge des Donors und des Gamma-Wertes korrigiert werden. Der Gamma-Wert berücksichtigt den Unterschied der Detektionseffizienzen des Donors und Akzeptors sowie deren Quantenausbeuten [101]. Die gemessenen FRET-Effizienzen bzw. Abstände liegen nahe am Förster-Radius, sodass diese eine größere Genauigkeit besitzen, als Abstände, die sich weiter vom Förster-Radius entfernt befinden. Jedoch ist der genaue Förster-Radius  $R_0$  des Systems aufgrund mehrerer Faktoren, wie z.B. der Zeitskala der Rotation der Fluorophore, der Linkerlänge und damit verbundene Flexibilität des Fluorophors sowie das zugängliche Volumen unbekannt.

Um absolute Abstände aus FRET-Messungen zu gewinnen, müssen daher einige Kriterien beachtet werden und erfüllt sein. Der Förster-Radius hängt vom Orientierungsfaktor  $\kappa^2$  und von der Quantenausbeute  $\Phi_D$  des Donors in Abwesenheit des Akzeptors ab und beide Faktoren können stark von der genauen Position des Fluorophors abhängen. Des Weiteren muss die freie Rotation der Fluorophore, die an das Protein gekoppelt sind, gewährleistet sein, welche mittels Fluoreszenzanisotropie-Messungen überprüft werden kann. Anisotropiewerte geben Aufschluss über den Orientierungsfaktor  $\kappa^2$  und da der Förster-Radius  $R_0$  von diesem abhängt, existiert ein Einfluss der Fluoreszenzanisotropie auf die Förster-Radien-Verteilung. Je höher der Wert der Anisotropie, desto größer wird die Abweichung zum Förster-Radius für  $\kappa^2=2/3$ . Weiterhin folgt,



dass somit auch der sich aus der FRET-Effizienz berechneter Abstand zwischen zwei Fluorophoren mit einem Fehler behaftet ist.

Die freie Bewegung der Fluorophore an der RNAP wurde überprüft, indem Anisotropiemessungen an einzeln und doppelt markierten RNAPs durchgeführt wurden. Da die Transkriptionsfaktoren TFE und Spt4/5 jeweils eine Bindungsstelle an der RNAP Clamp aufweisen, konnte durch vorherige Inkubation der einzelmarkierten RNAPs mit den Transkriptionsfaktoren TFE und Spt4/5 deren Einfluss auf die Farbstoffe getestet werden. Die Anisotropiewerte lagen insgesamt höher als 0,2. Als allgemeine Regel gilt, dass wenn die Fluoreszenzanisotropiewerte beider Fluorophore kleiner als 0,2 sind, der Wert des Orientierungsfaktors  $\kappa^2$  nahe  $2/3$  ist und die Fluorophore frei rotieren können [86]. Liegt der Wert höher als 0,2 so ist die Rotation des Fluorophors eingeschränkt und somit muss der Rückschluss auf die absoluten Abstände mit Vorsicht betrachtet werden. Jedoch wurden die Anisotropiewerte bei der Anbindung der Transkriptionsfaktoren an die RNAP nicht signifikant verändert und die Änderung der FRET-Effizienzen konnte daher auf die Änderung des Abstandes zurückgeführt werden.

Weiterhin spielt die Linkerlänge, welche die Länge zwischen dem Fluorophor und der reaktiven Gruppe, an die der Fluorophor gekoppelt ist, darstellt, eine Rolle [102]. Das zugängliche Volumen eines an ein Protein gekoppelten Fluorophors kann beispielsweise durch Molekulardynamik-Simulationen berechnet werden. Eine einfachere Methode verwendet die geometrische Ausdehnung des Fluorophors, die Linkerlänge und –breite. Es werden anschließend alle möglich zugänglichen Fluorophorpositionen unter der Voraussetzung, dass es zu keiner sterischen Hinderung mit dem Protein kommt, berechnet. Mit den hier gewählten Parametern ist kein direkter Kontakt zwischen den Fluorophoren zu erkennen, sodass verfälschende Ergebnisse durch z.B. Kontaktfluoreszenzlöschung ausgeschlossen werden können. Jedoch können das zugängliche Volumen und die mittlere Position der Fluorophore variieren und nicht in allen Messungen identisch sein.

Insgesamt können mit den Korrekturen Änderungen in der FRET-Effizienz und damit auch im Abstand, detektiert werden, jedoch kann der reale Abstand aufgrund der Unsicherheit des Förster-Radius nicht exakt berechnet werden. Jedoch zeigt der Vergleich zwischen dem ermittelten Abstand aus FRET-Messungen in z.B. der freien RNAP (4,7 nm) mit dem Abstand aus der RNAP Kristallstruktur aus *Sulfolobus solfataricus* (4,5 nm) eine gute Übereinstimmung und daher können die errechneten Abstände als gute Abschätzung betrachtet werden.

## 5.2 Die Konformation der Clamp in einer freien RNAP ist vorwiegend geschlossen

Zunächst wurde die Konformation der RNAP Clamp in einer freien RNAP gemessen und der Einfluss der Transkriptionsfaktoren TFE und Spt4/5 auf die Clamp Konformation untersucht. Die Clamp Domäne in einer freien RNAP, d.h. die RNAP ist nicht mit Nukleinsäuren assoziiert, weist zwei Populationen bei den FRET-Effizienzen  $E_1=0,38$  und  $E_2=0,66$  auf, welche den Abständen zwischen den beiden Fluorophoren  $R_1=5,7$  nm und  $R_2=4,7$  nm entsprechen. Die Abstände zwischen den Positionen in den archaeellen RNAPs aus *Thermococcus kodakarensis* und *Sulfolobus solfataricus*, die den markierten Aminosäuren in der RNAP aus *Methanocaldococcus jannaschii* entsprechen, betragen 6 nm bzw. 4,5 nm. Diese liegen somit in der gleichen Größenordnung wie die gemessenen Abstände. Durch die Zugabe der Untereinheiten Rpo4/7 wird der Anteil der Population bei höherer FRET-Effizienz um 8% erhöht und es kann daher angenommen werden, dass Rpo4/7 das Schließen der Clamp Domäne zu einem gewissen Grad induziert. Das Rpo4/7- abhängige (bzw. in Eukaryoten Rbp4/7) Schließen der RNAP Clamp wurde in den Kristallstrukturen der eukaryotischen RNAP aus *Saccharomyces cerevisiae* bereits beobachtet [45]. Des Weiteren zeigt die Kristallstruktur einer archaeellen RNAP, die die Untereinheiten Rpo4/7 enthält, ebenfalls eine geschlossene Konformation der RNAP Clamp [10]. Da der DNA-Bindungskanal frei von Nukleinsäuren ist, könnte die RNAP Clamp den Kanal vollständig schließen. Das unvollständige Schließen könnte dadurch erklärt werden, dass entweder nicht alle RNAPs die Untereinheiten Rpo4/7 enthalten oder dass, trotz Anbinden von Rpo4/7, immer noch eine offene Konformation der Clamp möglich ist, wie es z.B. in der RNAP Struktur aus dem Organismus *Thermococcus kodakarensis* beobachtet wurde [46].

Die Population bei niedrigerer FRET-Effizienz zeigt eine breite Verteilung, welche ein Hinweis darauf ist, dass schnelle strukturelle Änderungen vorhanden sein können, die jedoch mit der gewählten Zeitauflösung von 100 ms nicht aufgelöst werden konnten. Es wäre denkbar, dass die Clamp verschiedene Konformationszustände einnehmen kann. Dieses Ergebnis stimmt mit den FRET-Messungen an der bakteriellen RNAP Clamp gut überein und in Analogie zur bakteriellen RNAP Clamp [12], werden daher die zwei gefundenen Konformationen der archaeellen Clamp bei der FRET-Effizienz  $E=0,38$  als offen und bei  $E=0,66$  als kollabiert bezeichnet.

Die Clamp-Bewegung beruht auf zwei Mechanismen: einerseits kann die Clamp eine Schwingungsbewegung ausführen und so den Bindungskanal teilweise schließen, oder andererseits eine Rotationsbewegung durchführen [103]. Die letztere Bewegung ist, in

Anwesenheit von Rpo4/7, verantwortlich für das Schließen der Clamp in einer freien RNAP. In der bakteriellen RNAP geht die kollabierte Konformation der Clamp mit einer Rotation der Clamp von 22° einher [12]. In Hinblick auf den Transkriptionszyklus würde eine offene Konformation der RNAP Clamp Sinn machen, da so das Laden der DNA in das aktive Zentrum der RNAP gewährleistet wird [104]. Möglicherweise ist die RNAP Clamp aber bei physiologisch relevanten Temperaturen des Ursprungsorganismus *Methanocaldococcus jannaschii* flexibler, sodass sie entweder häufiger in einer offenen Position verweilt oder aber Fluktuationen zwischen den beiden Konformationen möglich sind. Des Weiteren könnten auch der Transkriptionsfaktor TFB einen Einfluss auf die RNAP Clamp haben, da dieser direkt mit der RNAP wechselwirken kann.

Das Anbinden von Rpo4/7 an die RNAP wird durch die Untereinheit Rpo6 vermittelt [42]. RNAPs, bei denen die Untereinheiten Rpo4/6/7 fehlen, können weiterhin RNA synthetisieren, jedoch ist ihre Aktivität im Vergleich zu RNAP Wildtyp geringer [38]. Die Histogramme der dreifach markierten RNAP $\Delta$ Rpo4/6/7 in An- und Abwesenheit von Rpo4/7 zeigen eine noch breitere Verteilung der Population bei  $E=0,69$ , als in den Histogrammen der freien RNAP $\Delta$ Rpo4/7 und RNAP Wildtyp. Die Population bei der FRET-Effizienz  $E=0,69$  enthält einen größeren Anteil an Molekülen (85%) sowie eine höhere Standardabweichung (0,15), verglichen mit der Population der RNAP $\Delta$ Rpo4/7 und RNAP Wildtyp. Die RNAP Clamp ist u.a. an die Untereinheit Rpo6 über eine „switch region“ gebunden, die sehr flexibel ist und eine Bewegung der Clamp erlaubt [14]. Ohne Rpo6 könnte die Clamp möglicherweise eine noch höhere Flexibilität erreichen. Die RNAP $\Delta$ Rpo4/6/7 zeigt im Vergleich zur RNAP $\Delta$ Rpo4/7 keinen signifikanten Unterschied in der Aktivität [38], was darauf hindeutet, dass kein eindeutiger Rückschluss zwischen der Konformation der Clamp in einer freien RNAP und der Aktivität (die RNAP ist dabei Teil des Elongationskomplexes) gezogen werden kann.

Die Transkriptionsfaktoren TFE und Spt4/5 teilen sich eine überlappende Bindungsstelle an der Spitze der RNAP Clamp [22, 43] und könnten deshalb die Position der Clamp beeinflussen. Neben dieser Bindungsstelle, existiert für TFE eine weitere Interaktionsstelle: die *Stalk*-Domäne [49]. Wird die freie RNAP Wildtyp in Anwesenheit von TFE gemessen, so erhöht sich der Anteil der Moleküle in der Population bei höherer FRET-Effizienz, was schließlich in einer definierten Population resultiert. Dahingegen wird bei der freien RNAP $\Delta$ Rpo4/7 das Schließen der RNAP Clamp in Anwesenheit von TFE nicht erreicht. Dieses Ergebnis zeigt gute Übereinstimmung mit den bisherigen gewonnenen Daten, die zeigten, dass das Anbinden von TFE an die RNAP von den Untereinheiten Rpo4/7 abhängt [22].

Der Elongationsfaktor Spt4/5 bindet ebenfalls an die RNAP Clamp, wie in der Kristallstruktur eines Komplexes bestehend aus archaeeller RNAP aus dem Organismus *Py-*

*rococcus furiosus* und Spt4/5 gezeigt wurde [51]. Daneben existiert eine weitere Bindungsstelle an der RNAP, die der RNAP Clamp gegenüber liegt. Die NGN-Domäne des bakteriellen RfaH, das zur NusG-Familie gehört und somit dem Spt4/5 aus Archaeen und Eukaryoten verwandt ist, bindet an die zur RNAP Clamp gegenüber liegenden Seite, dem  $\beta$ -Gate-Loop [105]. Die zwei Bindungsstellen von Spt4/5 an der RNAP wurden mit Hilfe der Kryo-Elektronenmikroskopie auch in einer archaeellen Struktur (*Pyrococcus furiosus*) gezeigt [50]. Da der Elongationsfaktor NusG/Spt4/5 in allen drei Domänen des Lebens konserviert ist [63], könnten somit diese Bindungsstellen für alle Organismen gelten. Bei Zugabe von Spt4/5 zur freien dreifach markierten RNAP Wildtyp erhöht sich der Anteil der Population bei der FRET-Effizienz  $E=0,66$  signifikant und resultiert in einer definierten Population. Da der DNA-Bindungskanal der RNAP keine DNA enthält und somit keine sterische Hinderung existiert, kann Spt4/5 die Clamp komplett schließen. Mit Hilfe von biochemischen Daten wurde gezeigt, dass die freie RNAP in Anwesenheit von Spt4/5 keine DNA mehr laden kann und die Assoziation der Promoter-DNA verhindert wird [22]. Aufgrund der zwei Bindungsstellen von Spt4/5 an der RNAP, besitzt der Elongationsfaktor die Möglichkeit, sich über den DNA-Bindungskanal zu spannen. Dadurch könnte Spt4/5 die Rekrutierung der RNAP auf die Promoter-DNA verhindern und somit die Transkription unterdrücken und /oder regulieren.

### 5.3 TFE öffnet die RNAP Clamp im Prä-Initiationskomplex

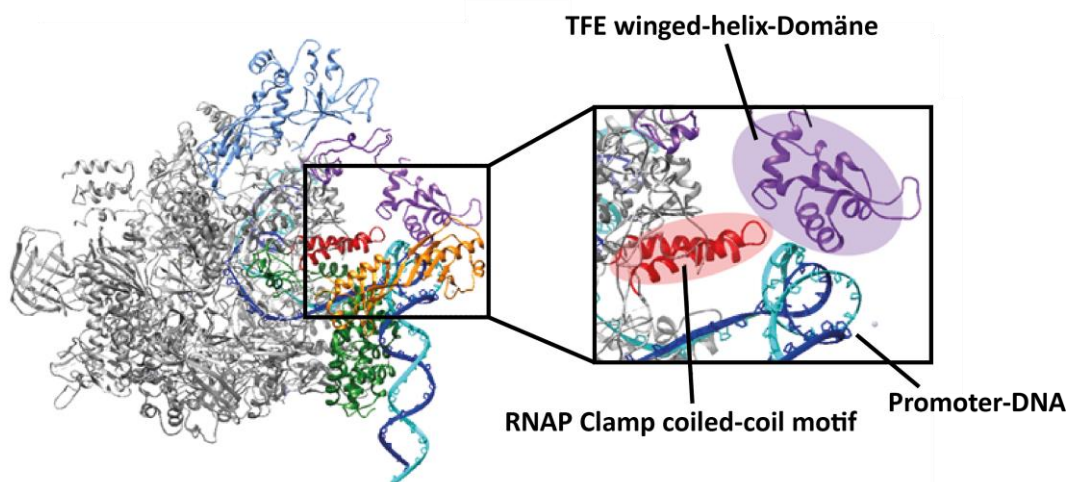
Der Prä-Initiationskomplex setzt sich aus der Promoter-DNA, den Transkriptionsfaktoren TBP und TFB, und der RNAP zusammen. Zunächst liegt die Promoter-DNA doppelsträngig vor und diese Form des PIKs wird als geschlossener Komplex bezeichnet. Anschließend wird die DNA am Transkriptionsstartpunkt geschmolzen und der kodinge Strang wird in das aktive Zentrum der RNAP geladen, sodass ein offener Komplex vorliegt. Das DNA-Schmelzen kann durch einen weiteren Transkriptionsfaktor -TFE- stimuliert werden [36, 61]. Die dreidimensionale Struktur des Prä-Initiationskomplexes (PIK) konnte bis heute mittels Röntgenstrukturanalyse aufgrund seiner hohen Flexibilität und Größe nicht komplett gelöst werden. Es existieren jedoch jeweils Kryo-Elektronenmikroskopie-Modelle des humanen PIKs und des PIKs aus *Saccharomyces cerevisiae* [47, 106]. Des Weiteren wurde ein Modell des archaeellen PIKs mittels Einzelmolekül-FRET-Messungen generiert [49]. In den genannten Beispielen liegt der Fokus auf der ganzheitlichen Sicht des PIKs, jedoch nicht auf der Konformation der RNAP Clamp.

Die RNAP Clamp in einem geschlossenen PIK, in der die Promoter-DNA durchgehend doppelsträngig vorliegt (Homoduplex-DNA), weist zwei deutlich voneinander getrennte Populationen mit FRET-Effizienz-Maxima ( $E_1=0,42$ ,  $E_2=0,62$ ) auf, wobei die Population bei höherer FRET-Effizienz einen größeren Anteil (87%) besitzt. Wird die Promoter-DNA mit einer künstlichen Transkriptionsblase von 4 Basenpaaren verwendet (Heteroduplex-DNA, offener Komplex), so sind die FRET-Effizienzen im Vergleich zum geschlossenen PIK ähnlich, jedoch sinkt der Anteil der Moleküle in der Population mit höherer FRET-Effizienz auf 62%. Der Vergleich zwischen den Histogrammen des geschlossenen und offenen Komplexes lässt die Vermutung zu, dass die Population bei höherer FRET-Effizienz der RNAP Clamp Konformation bei geschlossener Promoter-DNA, während die Population bei niedrigerer FRET-Effizienz der Clamp Konformation bei offener Promoter-DNA entspricht.

Des Weiteren ist kein Unterschied zwischen einer RNAP Wildtyp-Variante und einer RNAP $\Delta$ Rpo4/7-Variante, weder bei den FRET-Effizienzen sowie der Populationsverteilung, zu erkennen. Dies könnte bedeuten, dass die Position der Clamp hauptsächlich vom engen Zusammenspiel zwischen der RNAP und TBP, TFB und der DNA bestimmt wird und Rpo4/7 eine untergeordnete Rolle einnimmt.

Das Anbinden des Transkriptionsfaktors TFE an die RNAP verschiebt das Gleichgewicht bei beiden DNA-Konstrukten in Richtung der offenen RNAP Clamp Position (Änderung um 25% bzw. 11% für geschlossenen bzw. offenen Komplex). Die TFE *zinc-ribbon*-Domäne bindet die RNAP Untereinheiten Rpo4/7 und die TFE *winged-helix*-Domäne an die Spitze der RNAP Clamp [22, 49]. Als Negativkontrolle wurde deshalb eine doppelt markierte RNAP  $\Delta$ Rpo4/7 in den offenen PIK eingebaut und die Position der Clamp in Ab- und Anwesenheit von TFE gemessen. Es ist keine signifikante Änderung der Verteilung der Populationen zu erkennen. Strukturelle Informationen geben Hinweise darauf, wie TFE den offenen PIK stabilisieren könnte. Die *winged-helix*-Domäne des archaeellen TFEs bindet im Prä-Initiationskomplex den nicht-kodogenen Strang stromaufwärts des Transkriptionsstartpunkts [61]. Weitere Daten zeigen, dass auch das eukaryotische TFIIIE, ein TFE-Homolog, den nicht-kodogenen Strang der Promoter-DNA an Position (-10) binden kann [107]. Die RNA Polymerase I enthält eine Untereinheit, A49, die teilweise zu TFIIIE verwandt ist und eine ähnliche Position innerhalb der RNAP wie TFIIIE und TFE besitzt. Es wurde gezeigt dass die *winged-helix*-Domäne der RNAPI-Untereinheit A49 ebenfalls DNA-bindungsfähig ist [108]. Daneben assoziiert TFE mit der *winged-helix*-Domäne, sowohl im eukaryotischen als auch im archaeellen RNAP-System, an die RNAP Clamp-Domäne [22, 49, 109]. Des Weiteren wurden die Positionen (-10), (-12) und (-14) des nicht-kodogenen Strangs in direkter Nähe zu der RNAP Clamp mit Hilfe von Einzelmolekül-FRET-Messungen be-

stimmt [49]. Aufgrund dieser Position von TFE im Prä-Initiationskomplex, könnte TFE die geschmolzene Transkriptionsblase im Initiationskomplex stabilisieren und so die Initiation stimulieren [107]. Weiterhin könnte TFE den nicht-kodogenen Strang an der RNAP Clamp fixieren und so eine Re-Hybridisierung der Promoter-DNA verhindern [62] (s. Abbildung 5.3.1). Der Vergleich zwischen den Einzelmolekül-FRET-Messungen des PIKs mit Homo- und Heteroduplex-DNA zeigt auf, dass bei geschlossener DNA die RNAP Clamp vorwiegend in einer geschlossenen und bei vorgeschmolzener DNA die Clamp in einer offenen Konformation vorliegt. Durch Zugabe von TFE wird die offene Clamp Konformation favorisiert und dies kann so interpretiert werden, dass TFE das Öffnen der RNAP Clamp im Prä-Initiationskomplex verursacht. Da TFE den offenen PIK, in der der kodogene Strang in das aktive Zentrum der RNAP geladen ist, stabilisiert, könnten die zwei gefundenen Populationen folgendermaßen zugeordnet werden: die Population bei höherer FRET-Effizienz entspricht RNAP-Molekülen, die die Promoter-DNA nicht in das aktive Zentrum der RNAP geladen, während die Population bei niedrigerer FRET-Effizienz RNAP-Molekülen entspricht, die den kodogenen Strang im aktiven Zentrum positioniert haben. Der Zustand der RNAP Clamp bei kleinerer FRET-Effizienz wird deshalb als offene und die Position der Clamp bei der höheren FRET-Effizienz als geschlossene Konformation bezeichnet.



**Abbildung 5.3.1:** Strukturmodell des archaeellen offenen Prä-Initiationskomplexes, das durch mehrere Einzelmolekül-FRET-Messungen in Kombination mit dem *nanopositioning system* bestimmt wurde [49]. Der Prä-Initiationskomplex besteht aus der Promoter-DNA (nicht-kodogener Strang: cyan; kodogener Strang: blau), TBP (orange), TFB (grün), TFE (violett) und der RNAP (grau). Die RNAP Untereinheiten Rpo4/7 sind in hellblau gekennzeichnet. Die TFE *winged-helix*-Domäne, der nicht-kodogene Strang der Promoter-DNA (Position -13 bis -9) und das RNAP Clamp *coiled-coil motif* (rot) befinden sich in unmittelbarer Nähe.

Bisher existieren unterschiedliche Daten zu der RNAP Clamp Konformation im Prä-Initiationskomplex. Die Struktur des humanen Prä-Initiationskomplexes, die mittels

Kryo-Elektronenmikroskopie erhalten wurde, zeigt die RNAP Clamp nach Zugabe der Promoter-DNA und TFIIF zur RNAP in einer leicht geöffneten Konformation [47], was eine gute Übereinstimmung mit den hier gefundenen Ergebnissen zeigt. Jedoch schließt sich beim Übergang vom geschlossenen zum offenen PIK die RNAP Clamp über den DNA-Bindungskanal. Das Schließen der RNAP Clamp nach Zugabe der Promoter-DNA wurde auch bei den Einzelmolekül-FRET-Studien anhand der bakteriellen RNAP Clamp beobachtet [12]. Im eukaryotischen RNAIIP System wurde eine dynamische Bewegung der Promoter-DNA im Prä-Initiationskomplex in Abwesenheit von TFIIE gezeigt [110], was möglicherweise in einer dynamischen RNAP-Clamp Bewegung resultieren kann. Eine Dynamik in den Einzelmolekül-FRET-Spuren wurde hier aber nicht beobachtet. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass bei physiologisch relevanter Temperatur (ca. 85°C) der archaeellen RNAP, eine Dynamik zwischen der geschlossenen und offenen Clamp Konformation entsteht. Die Zugabe eines darauffolgenden richtigen Nukleotids (GTP) führt zu keiner signifikanten Veränderung der FRET-Effizienzen und Populationen. Ein ähnliches Ergebnis wurde bei den Einzelmolekül-FRET-Messungen mit der bakteriellen RNAP erhalten [12]. Die RNAP synthetisiert zunächst einige kurze RNA-Transkripte (bis zu 11 Nukleotide lang), die schnell wieder dissoziieren (abortive Initiation) [66, 111]. Für die bakterielle RNAP wurde gezeigt, dass die abortive Initiation durch einen *DNA scrunching* Mechanismus entsteht [66]. Die RNAP bleibt dabei fest auf der Promoter-DNA assoziiert, während die DNA in das aktive Zentrum gezogen wird. Dieser Mechanismus beginnt jedoch erst nach Zugabe von mehr als zwei Nukleotiden [111], was wiederum bedeutet, dass Zugabe eines Nukleotids im Initiationsschritt noch nicht ausreichen könnte, um eine konformationelle Änderung der Clamp hervorzurufen.

## 5.4 RNAP Clamp Konformationen im Elongationskomplex

Die nächste Phase des Transkriptionszyklus, die Elongationsphase, beginnt, sobald die RNAP ein ausreichend langes RNA-Polymer synthetisiert und die Promoter-Region verlassen hat [1]. Die RNAP synthetisiert RNA, indem sie sich auf der Promoter-DNA entlang bewegt und den kodogenen Strang als Matrize verwendet. Der Elongationskomplex besteht daher aus der doppelsträngigen DNA, der RNA und der RNAP. Der Komplex wird im Experiment realisiert, indem die doppelt markierte RNAP spezifisch auf ein DNA/RNA-Hybrid rekrutiert wird. Die Immobilisierung des Elongationskomplexes erfolgt durch den mit Biotin modifizierten nicht-kodogenen Strang und die Bildung des Komplexes ist abhängig von der Anwesenheit der RNA. Der Elongationskomplex wurde zunächst mit einer RNA, die eine Länge von 14 Nukleotiden besitzt, geformt.

Die Konformation der RNAP Clamp zeigt auch im Elongationsschritt zwei Populationen mit den mittleren FRET-Effizienzen von  $E_1=0,50$  und  $E_2=0,62$ , welche den Abständen  $R_1=5,2\text{ nm}$  und  $R_2=4,8\text{ nm}$  entsprechen. Der Einfluss von Rpo4/7 auf die mittleren FRET-Effizienzen und Verteilung der Populationen sind nicht signifikant. Der Vergleich der Kristallstrukturen der Elongationskomplexe aus *Saccharomyces cerevisiae*, die zum einen eine RNAP aus 10 Untereinheiten und eine RNAP aus 12 Untereinheiten enthalten, zeigen, dass der Abstand zwischen der Spitze der Clamp Domäne und der dazu gegenüberliegenden Seite keinen Unterschied zeigt [15, 17]. In beiden Fällen beträgt der Abstand 4 nm. Somit liegt eine klare Übereinstimmung zwischen den gemessenen Einzelmoleküldaten und den Kristallstrukturen vor, da gezeigt wird, dass die Konformation der RNAP Clamp im Elongationskomplex von Rpb4/7 bzw. Rpo4/7 unabhängig ist.

In den Kristallstrukturen ist im Gegensatz zu den gemessenen Daten nur ein Abstand zu finden, was möglicherweise daran liegt, dass die Kristallstrukturen nur ein starres Bild widerspiegeln. Wird die Position der Farbstoffe getauscht, so ändern sich die Histogramme ebenfalls nicht, woraus geschlossen werden kann, dass die Farbstoffchemie und farbstoffspezifische Wechselwirkung mit Aminosäuren in der lokalen Umgebung der Kopplungsstelle keinen Einfluss auf das Ergebnis haben.

Die RNAP Clamp im Elongationskomplex, der über die RNAP immobilisiert wird, zeigt ebenfalls zwei Konformationen. Die mittleren FRET-Effizienzen entsprechen denen der Messung, bei der die Immobilisierung des Elongationskomplexes über die DNA erfolgt, jedoch ist die Verteilung der Populationen unterschiedlich. Dies liegt möglicherweise daran, dass nicht jede dreifach markierte RNAP das DNA/RNA-Hybrid geladen hat und dies zu einer Mischung der Ergebnisse von freier RNAP in An- und Abwesenheit des DNA/RNA-Hybrids führt.

Anisotropie-Messungen der Assoziation von den Untereinheiten Rpo4/7 und einer RNA zeigen, dass die RNA mit den RNAP Untereinheiten Rpo4/7 interagieren kann [37]. Um den Einfluss der längeren RNA auf die RNAP Clamp Konformation zu testen, wurde für die Bildung des Elongationskomplexes eine längere RNA, bestehend aus 35 Nukleotiden, verwendet. Diese Länge ist ausreichend, um die Untereinheiten Rpo4/7 zu erreichen. Es wird jedoch kein Unterschied zwischen den Messungen des Elongationskomplexes, der eine kurze oder eine lange RNA enthält, gefunden. Dies könnte bedeuten, dass die Konformation der Clamp allein durch das Netzwerk zwischen RNAP und dem DNA/RNA-Hybrid beeinflusst wird. Die Ergebnisse zeigen weiterhin, dass die RNAP Clamp in der Elongationsphase zwei Konformationen annimmt.



Um die zwei Populationen weiter zu charakterisieren, wurde die RNAP auf ein DNA/RNA-Hybrid, bestehend aus einem kodogenen Strang und einer RNA, rekrutiert. Der Elongationskomplex, der mit kodogenen Strang/RNA gebildet wird, wurde über ein Biotin am kodogenen Strang immobilisiert. Die RNAP kann die Kombination aus kodogenem Strang und RNA für die Transkriptionselongation verwenden [38], jedoch besitzt sie eine geringere Prozessivität, als in einem Elongationskomplex, der auch den nicht-kodogenen Strang enthält [43]. Des Weiteren ist der nicht-kodogene Strang wichtig für die DNA/RNA-Separation an der stromaufwärts liegenden Transkriptionsblase und die Abwesenheit des nicht-kodogenen Strangs führt zu einer rückschreitenden Bewegung der RNAP [112]. Die Konformation der RNAP Clamp spiegelt sich in einer definierten Population mit einer FRET-Effizienz von  $E=0,62$  wider. Die Zugabe des nicht-kodogenen Strangs zum Assemblierungsansatz führt zu einer Wiederherstellung der Population bei der FRET-Effizienz von  $E=0,50$ , wobei die Population bei  $E=0,62$  immer noch zu einem geringeren Anteil erhalten bleibt. Die Population bei der FRET-Effizienz von  $E=0,62$  könnte daher dem nicht-prozessiven Zustand und die Population bei der FRET-Effizienz von  $E=0,50$  dem prozessiven Zustand der RNAP zugeordnet werden. Möglicherweise benötigt die RNAP eine leicht geöffnete Position der Clamp, um die Wahrscheinlichkeit für das Pausieren und die rückschreitende Bewegung entlang der DNA-Matrize zu verringern. Kristallstrukturanalysen anhand der eukaryotischen RNAPI zeigen, dass die RNAPI zwischen einem inaktiven und aktiven Zustand wechseln kann und dass diese Umwandlung die katalytischen Eigenschaften der RNAP beeinflusst [113]. Da die strukturellen Änderungen im aktiven Zentrum der RNAPI gezeigt wurden, sind die Ergebnisse schwer mit den Ergebnissen der archaellen RNAP Clamp zu vergleichen, da nicht direkt Schlussfolgerungen hinsichtlich des aktiven Zentrums gezogen werden können. In der bakteriellen RNAP wurde beobachtet, dass die RNAP Clamp im Elongationskomplex eine geschlossene [12] und die pausierte RNAP eine offene Konformation annimmt [114] und somit zwei Konformationen im Elongationskomplex durchaus plausibel sind.

Neben dem nicht-kodogenen Strang erhöht auch der Elongationsfaktor Spt4/5 die Prozessivität der RNAP [43]. Die Zugabe des Elongationsfaktors Spt4/5 zum Elongationskomplex führt zu einer starken Verringerung der Population bei der FRET-Effizienz von  $E=0,62$  (der verbleibende Anteil der Moleküle in dieser Population beträgt 12%). Wie bei der freien RNAP schon diskutiert wurde, kann Spt4/5 die RNAP an dem Clamp *coiled-coil motif* binden [43, 50] und sich über den DNA-Bindungskanal spannen. Somit hat Spt4/5 die Möglichkeit die RNAP Clamp in einer festen Konformation zu arretieren. In Elongationskomplexen kann so die DNA-Matrize im aktiven Zentrum der RNAP stabilisiert [115] und eine Dissoziation des DNA/RNA-Hybrids verhindert werden [44]. Die-

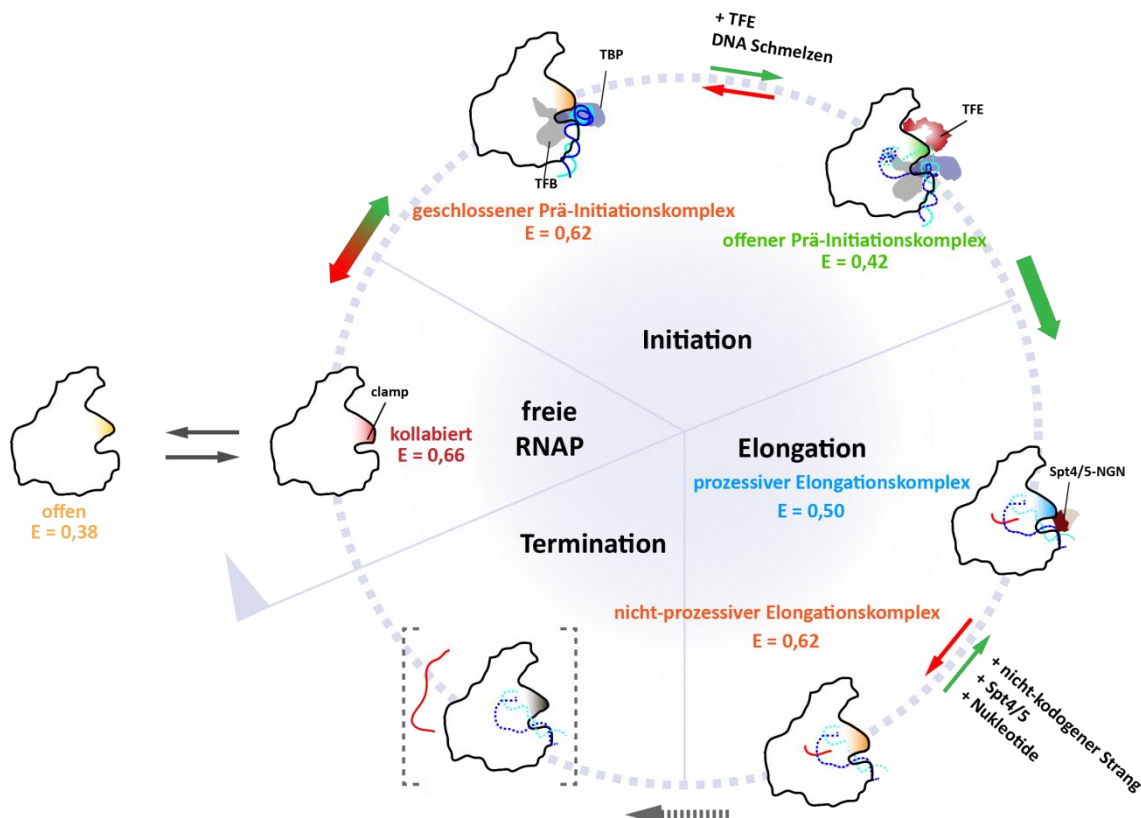
ses Ergebnis verstärkt demnach den Hinweis, dass die Population bei der FRET-Effizienz ( $E=0,50$ ) dem prozessivem Zustand der RNAP entspricht.

Als nächstes wurde der Einfluss des richtigen Nukleotids, das komplementär zur Position +1 im kodogenen Strang ist, eines falschen Nukleotids und eines Nukleotid-Analogons (AMPcPP) auf die RNAP Clamp Position untersucht. Dafür wurde neben der kurzen und langen RNA, noch eine weitere RNA verwendet, die im Vergleich zur RNA T40, um ein Nukleotid in Richtung 3'-Ende verschobene Sequenz besitzt (RNA T43). Die Verteilung der Populationen, sowie die mittleren FRET-Effizienzen zeigen keinen Unterschied zur Messung, bei der die RNA T40 verwendet wurde. Die Zugabe des richtigen Nukleotids resultiert in einer fast kompletten Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung niedrigerer FRET-Effizienz von  $E=0,50$  (86%). Diese Konformation der RNAP Clamp ist vergleichbar mit der, die durch den nicht-kodogenen Strang und durch Spt4/5 hervorgerufen wird. Wird der Elongationskomplex mit dem falschen Nukleotid inkubiert, so ist diese Verschiebung nicht zu erkennen. Dies zeigt, dass die RNAP trotz ihrer Markierung noch die Fähigkeit besitzt, das Substrat korrekt zu erkennen. Die Zugabe des nicht-hydrolysierbaren Nukleotid-Analogons AMPcPP führt ebenfalls zu einer Verschiebung der Population in Richtung der niedrigeren FRET-Effizienz  $E=0,50$ . Dies bedeutet, dass die Bindung des Nukleotids im aktiven Zentrum der RNAP schon ausreicht, um eine Konformationsänderung der RNAP Clamp hervorzurufen und die Ausbildung der Phosphodiesterbindung dafür nicht zwingend erforderlich ist.

## 5.5 Zusammenfassende Darstellung der RNAP Clamp Konformationen

In allen gefundenen und für die Auswertung verwendeten Spuren wurde keine Dynamik beobachtet, d.h. die Spuren waren über die Messdauer von etwa 60 Sekunden hinweg stabil und es waren keine Fluktuationen zwischen den einzelnen Zuständen zu erkennen. Dies spricht dafür, dass die gefundenen Zustände ein „eingefrorenes Bild“ widerspiegeln und das möglicherweise bei höheren Temperaturen, die dem Temperaturoptimum von ca. 85°C des thermophilen Organismus *Methanocaldococcus jannaschii* entspricht, eine dynamische Heterogenität zu beobachten sein könnte. Dies würde einer Öffnungs- und Schließbewegung der RNAP Clamp widerspiegeln. Insgesamt wurden vier unterschiedliche Zustände der flexiblen RNA Polymerase Clamp innerhalb des Transkriptionszyklus identifiziert, die abhängig sind von a) den Untereinheiten Rpo 4/7 b) dem DNA-Schmelzen c) dem Anbinden des Transkriptionsfaktors TFE im Prä-Initiationskomplex d) dem Anbinden des Elongationsfaktors Spt4/5 und dem nicht-kodogenen Strang im Elongationskomplex und e) dem richtigen Nukleotid (s. Abbil-

dung 5.5.1). Es wurde zum ersten Mal gezeigt, dass die archaeele RNAP Clamp konformationelle Änderungen durchläuft und dass diese Änderungen von ihren Transkriptionsfaktoren sowie Nukleinsäuren beeinflusst werden. In jeder Phase des Transkriptionszyklus existieren jeweils zwei Konformationen der RNAP Clamp, die jedoch in den einzelnen Phasen nicht identisch sind. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die RNAP Untereinheit Rpo2'' konformationelle Änderungen durchläuft oder eine Bewegung zwischen den *shelf* und *core modules* der RNAP existiert.



**Abbildung 5.5.1:** Zusammenfassende Darstellung der möglichen Konformationen der archaeele RNAP Clamp innerhalb des Transkriptionszyklus. In der freien RNAP wurden zwei Populationen mit den FRET-Effizienzen von  $E=0,38$  und  $E=0,66$  gefunden, wobei die erstere einer offenen und letztere einer kollabierten Konformation der RNAP Clamp entspricht. Der Transkriptionsfaktor TFE und der Elongationsfaktor Spt4/5 beeinflussen beide die Konformation der Clamp, was in einer kollabierten Konformation resultiert. Im Prä-Initiationskomplex können die Populationen mit den FRET-Effizienzen von  $E=0,42$  und  $E=0,62$  der offenen und geschlossenen RNAP Clamp Konformation zugeordnet werden. Eine künstliche vorgefertigte Transkriptionsblase in der Promoter-DNA, dass das Laden des kodogenen Strangs ins aktive Zentrum der RNAP erleichtert sowie die Zugabe von TFE führen zum Öffnen der RNAP Clamp. In der Elongationsphase existieren ebenfalls zwei Populationen mit den FRET-Effizienzen  $E=0,50$  und  $E=0,62$ , die die RNAP in einem prozessivem und nicht-prozessivem Zustand widerspiegeln. Die RNAP Clamp Konformation wird dabei vom nicht-kodogenen Strang, von Nukleotiden und von Spt4/5 beeinflusst (übernommen und verändert nach [100]).

## 6 Ausblick

Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente zeigen, dass die RNAP Clamp strukturell sehr flexibel ist und unterschiedliche Konformationen innerhalb des Transkriptionszyklus einnehmen kann. Werden diese Ergebnisse mit biochemischen Daten verglichen, so lassen sich Rückschlüsse auf die Verbindung zwischen Struktur und Funktion der RNAP ziehen. Da bis dato keine hochauflösende Kristallstruktur des kompletten Prä-Initiationskomplexes existiert, können weitere Fluoreszenzeinzelmolekülmessungen Aufschluss über weitere konformationelle Reorientierung von mobilen Domänen der RNAP und der Transkriptionsfaktoren Auskunft geben. Zum Beispiel könnte der Transkriptionsfaktor TFB, der selbst aus zwei sehr flexiblen Domänen (*zinc-ribbon* Domäne, C-Terminale Domäne) besteht, die durch eine Linker Region miteinander verbunden sind, weiter untersucht werden. Einer der flexiblen Domänen, der TFB Linker, ist in der Wahl des Transkriptionsstartpunktes involviert. TFB bindet mit der *zinc-ribbon*-Domäne an die RNAP und bildet so einen Komplex. Der TFB Linker befindet sich dabei nahe der RNAP Clamp. Mögliche Fragestellungen wären beispielsweise, welchen Einfluss TFB auf die Konformation der RNAP Clamp hat.

Da auch der Elongationsfaktor Spt4/5 eine Bindungsstelle an der Clamp aufweist, stellt sich die Frage, ob TFB vom Elongationsfaktor Spt4/5 verdrängt werden kann, wie es bereits bei TFE und Spt4/5 beobachtet wurde [22]. Eine alternative Möglichkeit dazu wäre, dass sich der TFB Linker in Anwesenheit von Spt4/5 neu arrangiert.

Des Weiteren kann die Struktur von TFB als Teil des Prä-Initiationskomplexes und die mögliche Änderung der TFB-Struktur durch Anbinden von TFE untersucht werden. Zudem könnte untersucht werden, ob die Bewegung der *winged-helix* Domäne von TFE im Prä-Initiationskomplex mit der RNAP Clamp Domäne korreliert. Des Weiteren wurde gezeigt, dass TFE sowohl im Prä-Initiationskomplex als auch im Elongationskomplex mit der RNAP assoziiert ist [49, 61], jedoch weisen biochemische Daten darauf hin, dass TFE in der Elongationsphase durch Spt4/5 verdrängt wird [22]. Daher wäre es von Interesse, wann TFE von der RNAP dissoziiert und ob Spt4/5 für die Dissoziation zwingend notwendig ist.

## 7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Personen bedanken, die mich während der Doktorarbeit sehr unterstützt haben.

Mein erster Dank geht an meinen Doktorvater Prof. Dr. Philip Tinnefeld für die hervorragende Betreuung meiner Doktorarbeit und die zahlreichen und wertvollen wissenschaftlichen Diskussionen. Daneben möchte ich ihm auch ganz herzlich für das entgegengebrachte Vertrauen danken, auch nicht-wissenschaftliche Aufgaben, wie z.B. die Organisation von Symposien, übernehmen zu können.

Ebenfalls möchte ich Prof. Dr. Dina Grohmann ganz herzlich für die ausgezeichnete Betreuung meiner Dissertation und die enge Zusammenarbeit danken. Vor allem danke ich ihr für ihre unermüdliche Geduld in Beantwortung meiner Biologiefragen und ihren Wissenstransfer, vor allem im Bereich der Mikrobiologie.

Ein ganz besonderer Dank geht an Andreas Gietl, der mir nicht nur im Gebiet der Einzelmolekülfluoreszenz sehr geholfen hat, sondern über 7 Jahre hinweg ein sehr guter Freund für mich war. Ich vermisse dich sehr!

Mein Dank gilt ebenso Dina Grohmann, Andreas Gietl, Bettina Wünsch, Adrian Zander, Alexander Gust und Kevin Kramm für die hilfreiche Unterstützung im Bio-und Chemielabor.

Für die Hilfe bei der Justierung des TIRF-Mikroskops, Durchführung der Messungen sowie der Programmierung des Auswerteprogramms und der Auswertung der Einzelmoleküldaten möchte ich mich bei Andreas Gietl, Ija Jusuk und Carsten Forthmann bedanken.

Für die Zusammenarbeit, die vielen Diskussionen und die aufschlussreichen Skype-Gespräche möchte ich mich bei Finn Werner und Katherine Smollett vom RNAP Lab am UCL bedanken.

Mein Dank geht auch an die fleißigen Korrekturleser Andreas Gietl, Bettina Wünsch, Phil Holzmeister, Ija Jusuk, Carsten Forthmann, Kevin Kramm, Philip Tinnefeld und Dina Grohmann für ihre konstruktiven Vorschläge und Kommentare.

Vielen Dank an Andreas Gietl, Carsten Forthmann, Carolin Vietz, Bettina Wünsch und Katharina Kraatz für ihre tolle Unterstützung während meiner Prüfungsvorbereitung und sich auch nicht davor gescheut haben, sich meinen Dissertationsvortrag immer und immer wieder anzuhören.

Danke auch an meinen Bürokollegen Guillermo Acuna für die entspannte Büroatmosphäre und seinen (leider erfolglosen) Versuchen mir Spanisch beizubringen. Muchas gracias!

Ein besonderer Dank geht an Carolin Vietz, Ija Jusuk, Bettina Wunsch, Carsten Forthmann, Andreas Gietl, Susanne und Phil Holzmeister, Anastasiya Puchkova, Max Scheible, Friederike Möller, Guillermo Acuna und Paul Hoffmann, die mein soziales Leben in Braunschweig sehr bereichert haben!

Mein letzter Dank richtet sich an meine Eltern und an meine Schwester Monika, die immer an mich geglaubt haben. Vielen Dank für eure Unterstützung und euren Rückhalt! Ohne sie wäre die Arbeit nicht möglich gewesen.

## Anhang A: Herstellung von Polyethylenglycol-passivierten Quarzoberflächen

Die Quarzoberflächen (75 x 25 mm, Science Services GmbH, München) und Deckgläser (24 mm x 60 mm, Roth) wurden zunächst über Nacht in einen Glasbehälter mit Piranha-Lösung (2/3 Schwefelsäure, 1/3 Wasserstoffperoxid) gestellt. Alle Bechergläser, Glasbehälter, der Erlenmeyerkolben und die „Stellkammern“ wurden zuvor in der Spülmaschine gereinigt. Anschließend folgten insgesamt drei Schritte:

### 1) Waschschrift:

- Jeweils die Quarzgläser (QG) und Deckgläser (DG) in den Glasbehältern mit 2% (v/v) Hellmanex im Ultraschallbad für 10 min sonifizieren
- Mit MilliQ-Wasser spülen
- QG und DG in MilliQ-Wasser im Ultraschallbad für 10 min sonifizieren
- QG und DG in Methanol p.a. für 10 min im Ultraschallbad sonifizieren

### 2) Aminosilanisierungsschritt:

- 350 ml Methanol p.a. mit 4 ml Aminosilan (A0700, Amchro GmbH, Hattersheim) im Erlenmeyerkolben gut vermischen
- 20 ml Essigsäure p.a. dazugeben und gut vermischen
- Lösung in die Glasbehälter mit den QG und DG füllen
- 10 min unter Lichtausschluss inkubieren
- 1 min im Ultraschallbad sonifizieren
- 10 min unter Lichtausschluss inkubieren
- QG in einer „Waschstraße“ bestehend aus Bechergläsern gefüllt mit Methanol und mehreren Bechergläsern MilliQ-Wasser erst mit Methanol spülen und anschließend in 4 x MilliQ-Wasser
- QG in einem Trockenschrank bei 40°C für eine Stunde trocknen lassen

### 3) PEGylierungsschritt:

- 1 ml einer gefilterten 10 mM Natriumcarbonatlösung zu 5 mg Biotin-PEG-Succinimidyl Valerate (Laysan Bio) und 200 mg m-PEG-Succinimidyl Valerate (Laysan Bio) pipettieren und für 1 min bei 16000 x g zentrifugieren
- Jeweils 90 µl auf die Quarzoberflächen pipettieren und die Deckgläser darauflegen und dabei Blasenbildung vermeiden
- 3 Stunden unter Lichtausschluss inkubieren

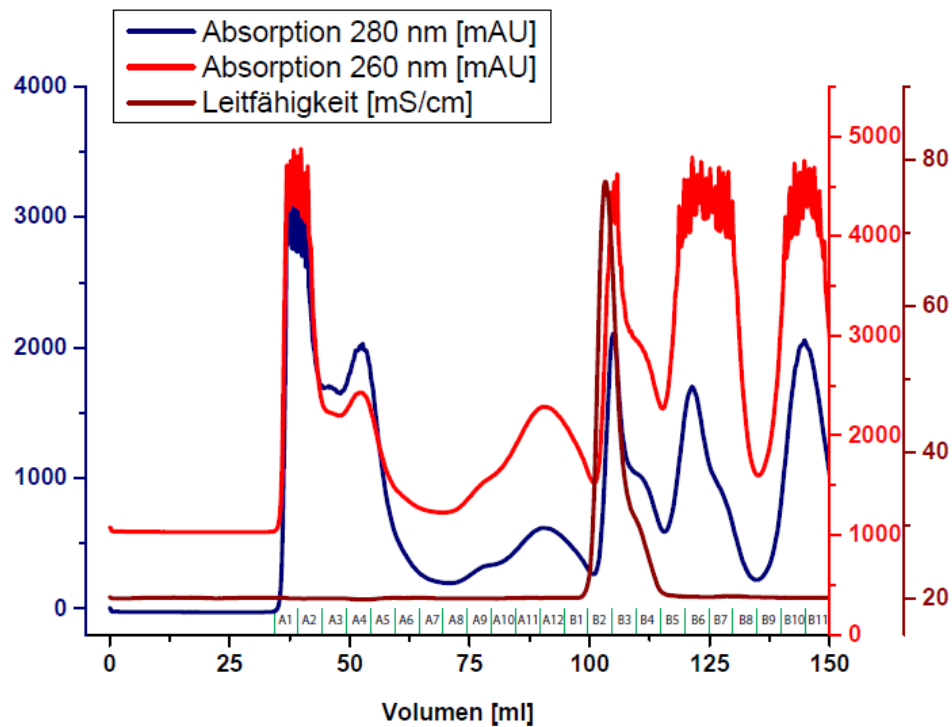
- Alle Oberflächen mit MilliQ-Wasser spülen und im Trockenschrank bei 40°C trocknen

Je ein passiviertes Quarzglas und ein Deckglas wurden in einem 50 ml Falkontube unter Vakuum bei -20°C gelagert.

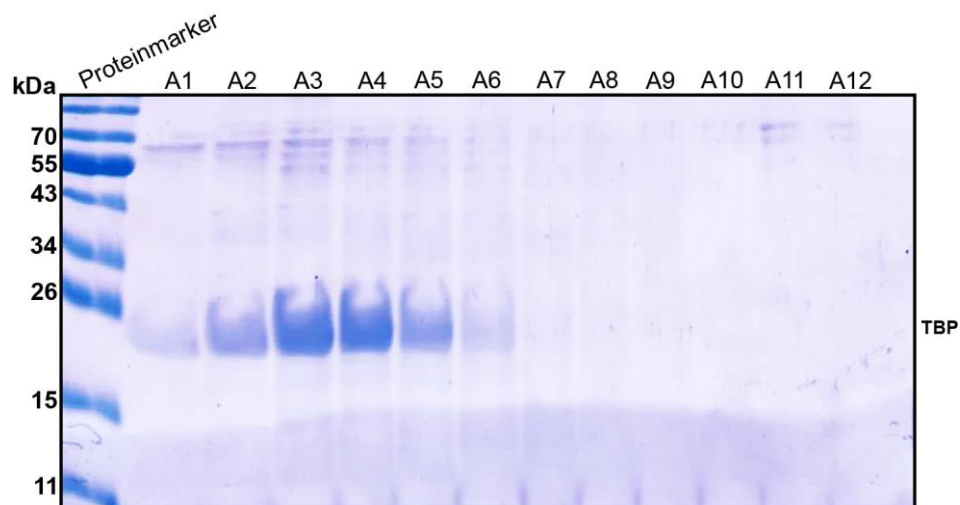


## Anhang B: Chromatogramme und SDS-Gele

### B.1 TBP

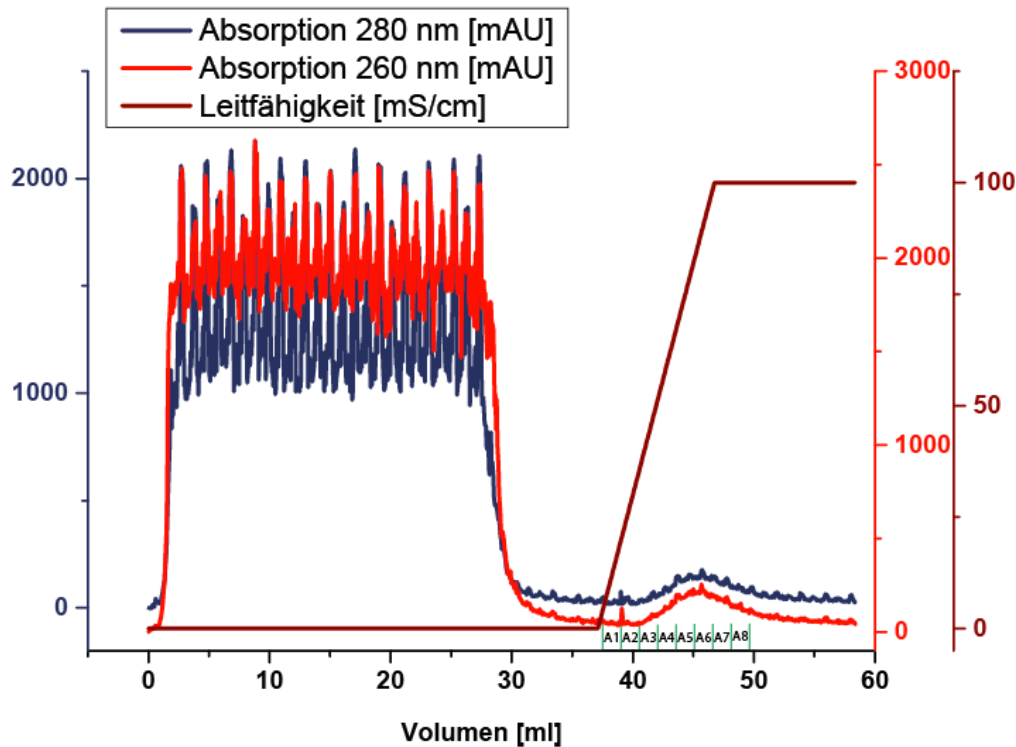


**Abbildung B.1.1:** FPLC-Chromatogramm des TBP-Gelfiltrationslaufs (HiPrep-Sephacryl, S-100 16/60). Die Absorptionen bei den Wellenlängen 280 nm (blau) und 260 nm (rot) und die Leitfähigkeit (braun) sind auf der y-Achse dargestellt. Auf der x-Achse sind das Durchflussvolumen des Puffers ( $P_{300}/\beta$ -Mercaptoethanol) und die gesammelten Fraktionen (jeweils 5ml) aufgetragen.

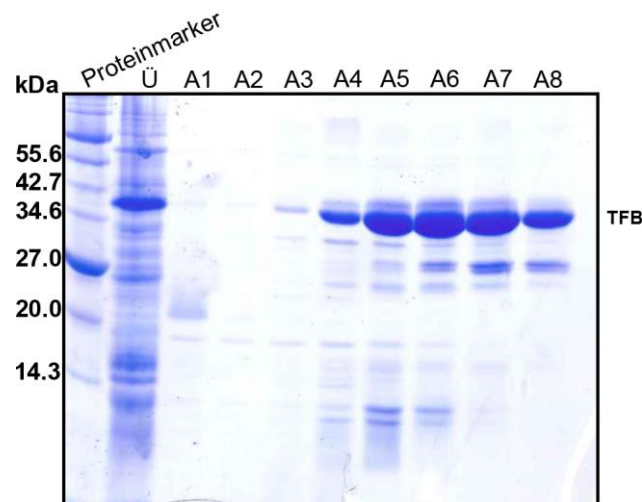


**Abbildung B.1.2:** 15%SDS-Gel, das die Elutionsfraktionen des Gelfiltrationslaufs mit TBP zeigt. Die Fraktionen A1-A12 sind auf dem SDS-Gel aufgetragen. Die Fraktionen A2-A4 wurden mit Hilfe eines Konzentrators (Amicon Ultra-15, MWCO:3000 Da, Merck Millipore) konzentriert.

## B.2 TFB

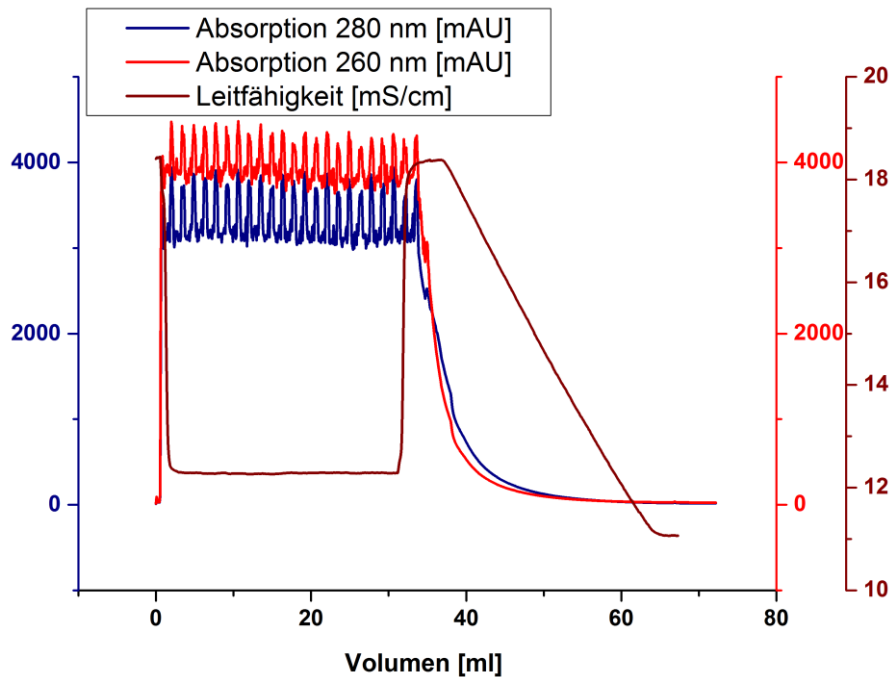


**Abbildung B.2.1:** FPLC-Chromatogramm des Affinitätschromatographielaufs für TFB<sup>His</sup> (HisTrap FF 1ml). Die Absorptionen bei den Wellenlängen 280 nm (blau) und 260 nm (rot) und die Leitfähigkeit (braun) sind auf der y-Achse dargestellt. Auf der x-Achse sind das Durchflussvolumen des Puffers (Puffer A: N<sub>500</sub>; 0,5% Triton; 20 mM Imidazol; Puffer B: N<sub>500</sub>; 0,5% Triton, 250 mM Imidazol) und die gesammelten Fraktionen (jeweils 1ml) aufgetragen.

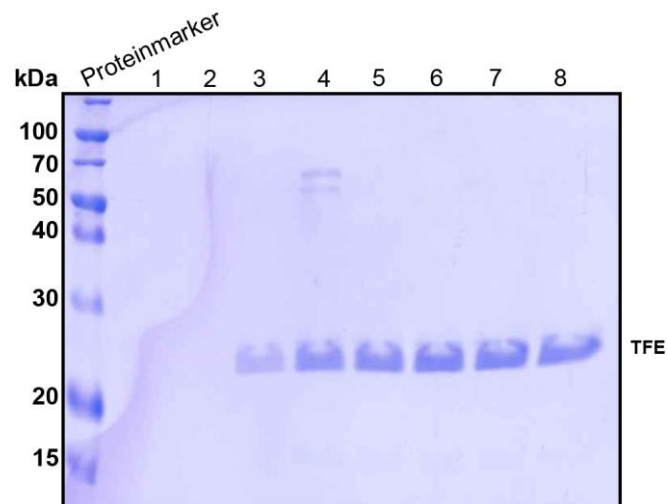


**Abbildung B.2.2:** 15%SDS-Gel, das die Elutionsfraktionen des Affinitätschromatographielaufs mit TFB<sup>His</sup> zeigt. Der Überstand (Ü) und die Fraktionen A1-A8 sind auf dem SDS-Gel aufgetragen. Die Fraktionen A4-A8 enthalten das Protein TFB.

### B.3 TFE

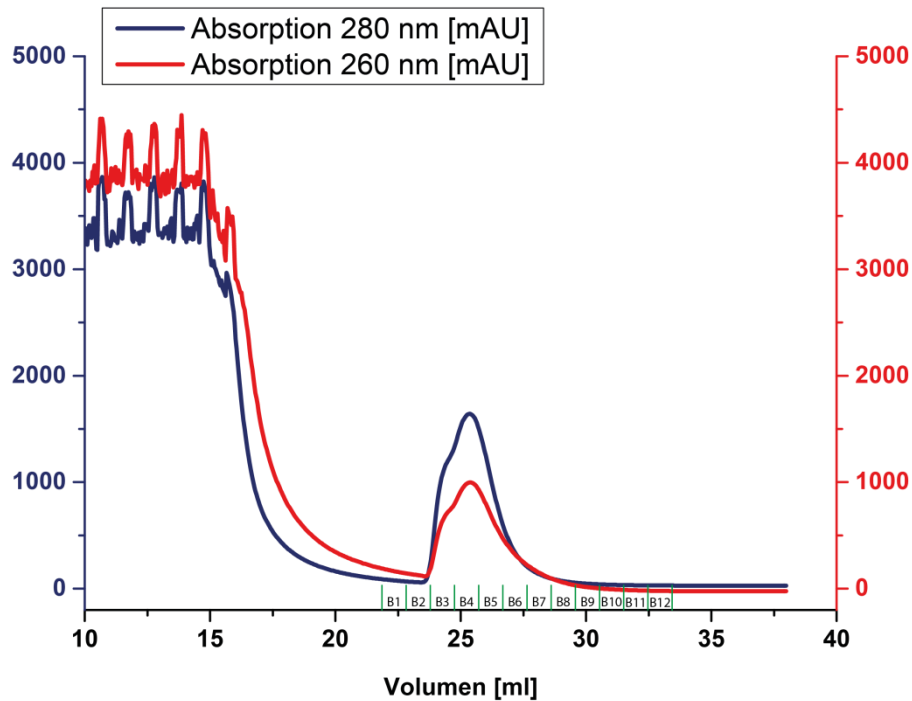


**Abbildung B.3.1:** FPLC-Chromatogramm des Affinitätschromatographielaufs für TFE (HisTrap FF 1ml). Die Absorptionen bei den Wellenlängen 280 nm (blau) und 260 nm (rot), sowie die Leitfähigkeit (braun) sind auf der y-Achse dargestellt. Auf der x-Achse sind das Durchflussvolumen des Puffers (Puffer A: 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 250 mM NaCl, 6 M Harnstoff; Puffer B: 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 250 mM NaCl, 30% Glycerin, 20 mM Imidazol). Die Elution erfolgte manuell mit dem Puffer C: 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 250 mM NaCl, 30% Glycerin, 250 mM Imidazol.

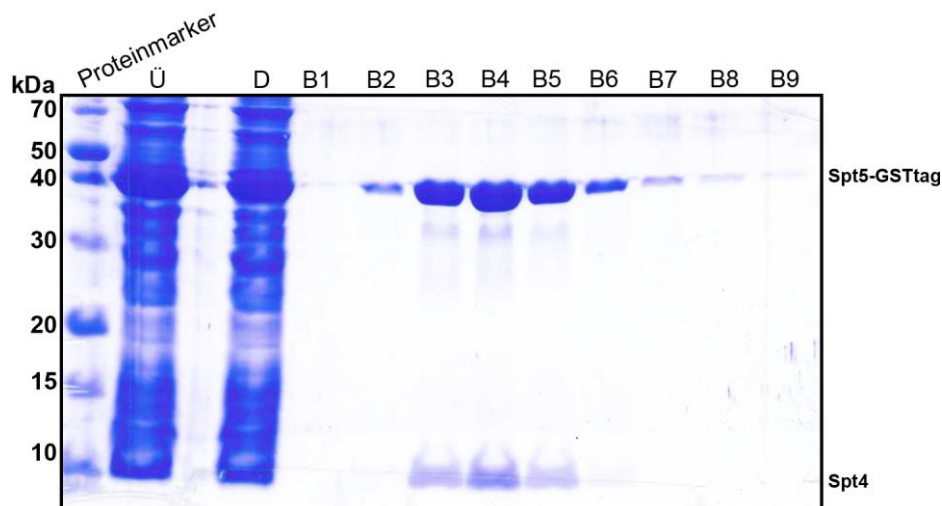


**Abbildung B.3.2:** 15%SDS-Gel, das die Elutionsfraktionen des Affinitätschromatographielaufs mit TFE zeigt. Die manuell gesammelten Fraktionen 1-8 sind auf dem SDS-Gel aufgetragen. Die Fraktionen 3-8 enthalten das Protein TFE.

## B.4 Spt4/5

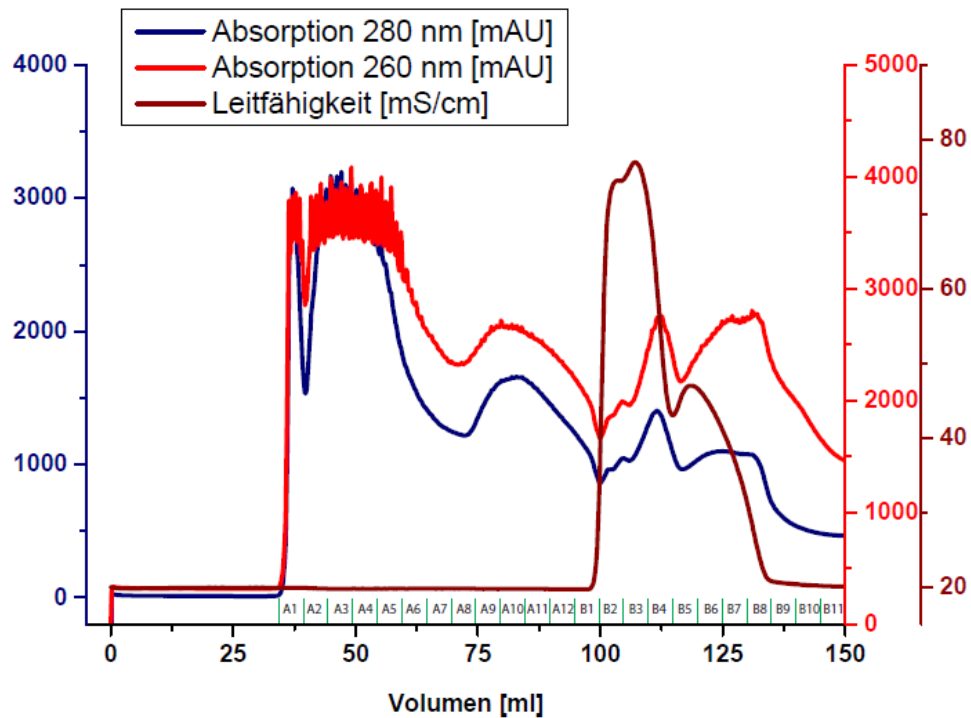


**Abbildung B.4.1:** FPLC-Chromatogramm des Affinitätschromatographielaufs für Spt4/5<sup>GST</sup> (GSTrap 1ml). Die Absorptionen bei den Wellenlängen 280 nm (blau) und 260 nm (rot) sind auf der y-Achse dargestellt. Auf der x-Achse sind das Durchflussvolumen des Puffers (Puffer A: P<sub>100</sub>/β-Mercaptoethanol; Puffer B: P<sub>100</sub>/5 mM DTT, 10 mM Glutathion) und die gesammelten Fraktionen (jeweils 1ml) aufgetragen.

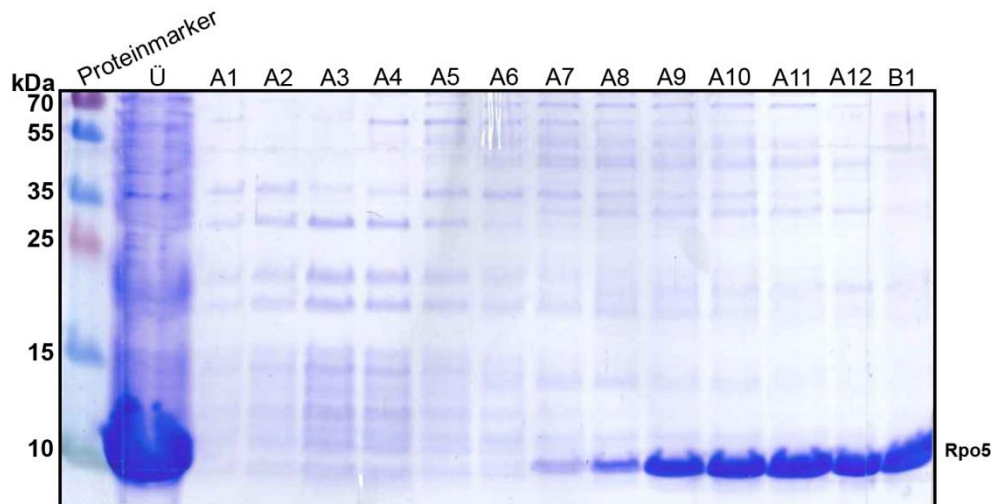


**Abbildung B.4.2:** 15%SDS-Gel, das die Elutionsfraktionen des Affinitätschromatographielaufs mit Spt4/5<sup>GST</sup> zeigt. Der Überstand (Ü), der Durchfluss (D) und die Fraktionen B1-B9 sind auf dem SDS-Gel aufgetragen. Die Fraktionen B3-B6 enthalten das Protein Spt4/5.

## B.5 Rpo5

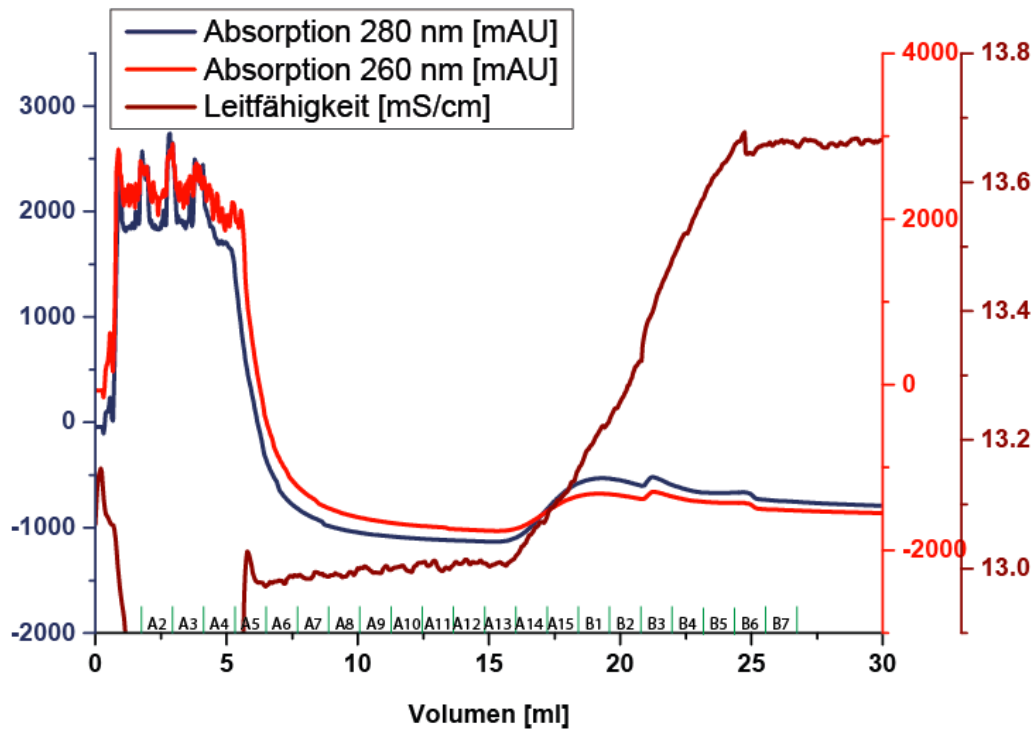


**Abbildung B.5.1:** FPLC-Chromatogramm Rpo5-Gelfiltrationslaufs (HiPrep-Sephacryl, S-100 16/60). Die Absorptionen bei den Wellenlängen 280 nm (blau) und 260 nm (rot) und die Leitfähigkeit (braun) sind auf der y-Achse dargestellt. Auf der x-Achse sind das Durchflussvolumen des Puffers (P<sub>300</sub>/β-Mercaptoethanol) und die gesammelten Fraktionen (jeweils 5ml) aufgetragen.

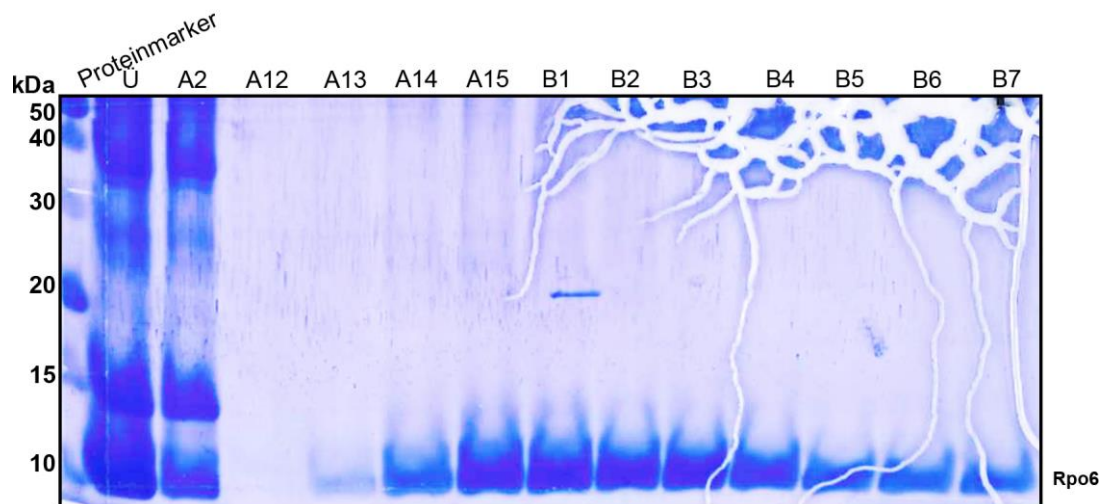


**Abbildung B.5.2:** 16%SDS-Gel, das die Elutionsfraktionen des Gelfiltrationslaufs mit Rpo5 zeigt. Der Überstand (Ü) und die Fraktionen A1-B1 sind auf dem SDS-Gel aufgetragen. Die Fraktionen A9-B1 wurden mit Hilfe eines Konzentrators (Amicon Ultra-15, MWCO:3000 Da, Merck Millipore) konzentriert.

## B.6 Rpo6

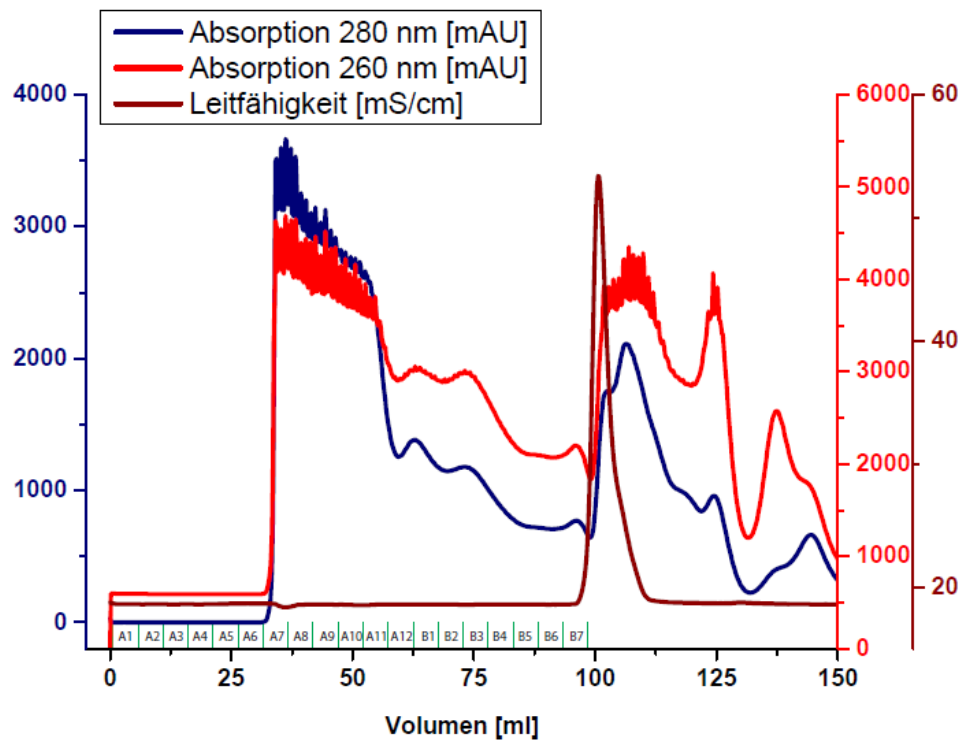


**Abbildung B.6.1:** FPLC-Chromatogramm des Affinitätschromatographielaufs für Rpo6<sup>His</sup> (HisTrap FF 1ml). Die Absorptionen bei den Wellenlängen 280 nm (blau) und 260 nm (rot) sind auf der y-Achse dargestellt. Auf der x-Achse sind das Durchflussvolumen des Puffers (Puffer A: P<sub>300</sub>, 6 M Harnstoff, 20 mM Imidazol; Puffer B: P<sub>300</sub>, 6 M Harnstoff, 250 mM Imidazol) und die gesammelten Fraktionen (jeweils 1 ml) aufgetragen.

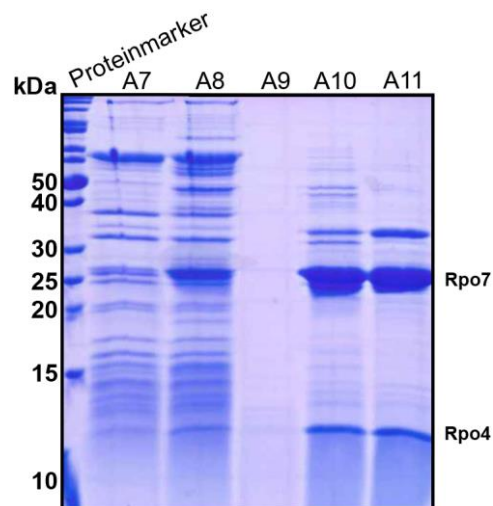


**Abbildung B.6.2:** 16%SDS-Gel, das die Elutionsfraktionen des Affinitätschromatographielaufs mit Rpo6<sup>His</sup> zeigt. Der Überstand (Ü) und die Fraktionen A2, A12-B7 sind auf dem SDS-Gel aufgetragen. Die Fraktionen A14-B7 enthalten das gewünschte Protein Rpo6<sup>His</sup>.

## B.7 Rpo4/7



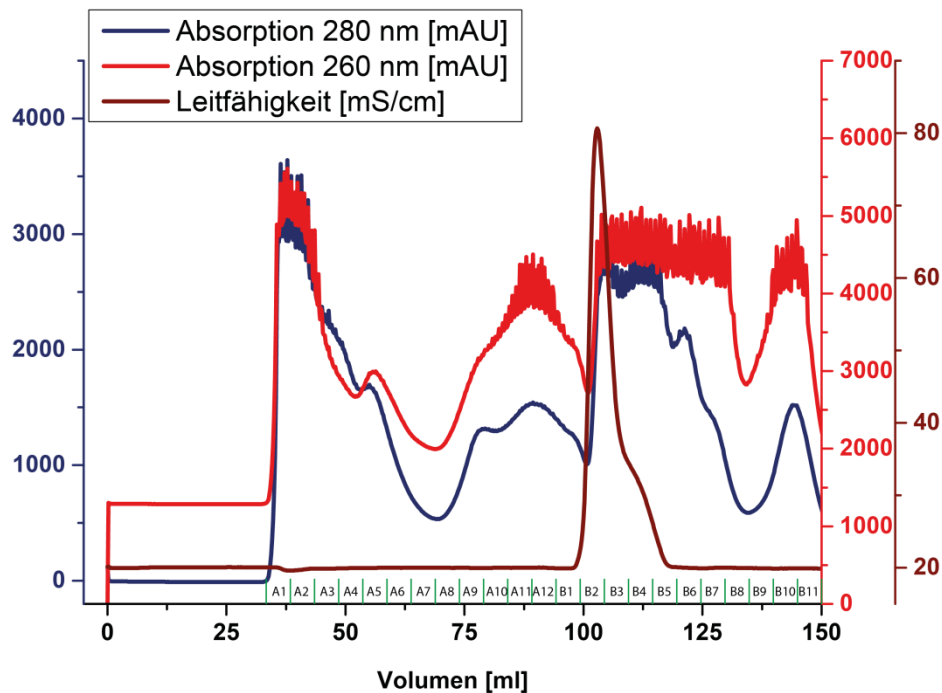
**Abbildung B.7.1:** FPLC-Chromatogramm Rpo4/7-Gelfiltrationslaufs (HiPrep-Sephacryl, S-100 16/60). Die Absorptionen bei den Wellenlängen 280 nm (blau) und 260 nm (rot) und die Leitfähigkeit (braun) sind auf der y-Achse dargestellt. Auf der x-Achse sind das Durchflussvolumen des Puffers (P<sub>300</sub>/β-Mercaptoethanol) und die gesammelten Fraktionen (jeweils 5ml) aufgetragen.



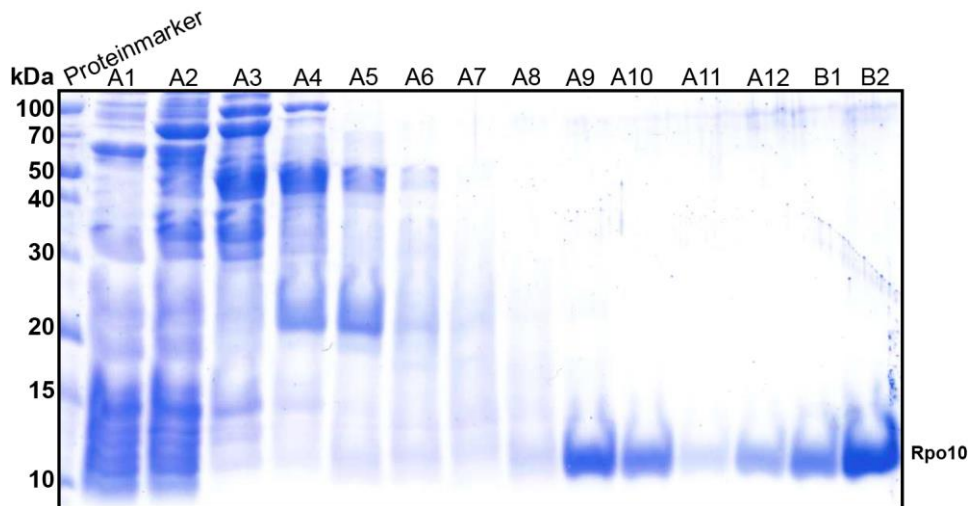
**Abbildung B.7.2:** 15%SDS-Gel das die Elutionsfraktionen des Gelfiltrationslaufs mit Rpo4/7 zeigt. Die Fraktionen A7-A11 sind auf dem SDS-Gel aufgetragen. Die Fraktionen A10 und A11 wurden mit Hilfe eines Konzentrators (Amicon Ultra-15, MWCO:3000 Da, Merck Millipore) konzentriert.



## B.8 Rpo10



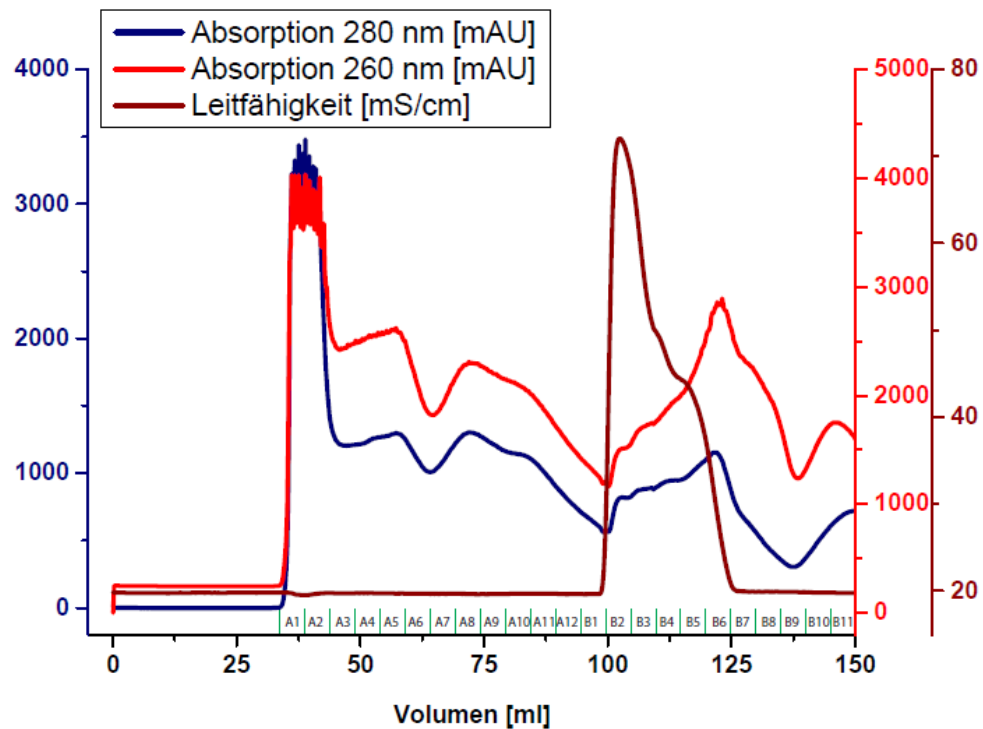
**Abbildung B.8.1:** FPLC-Chromatogramm des Rpo10-Gelfiltrationslaufs (HiPrep-Sephacryl, S-100 16/60). Die Absorptionen bei den Wellenlängen 280 nm (blau) und 260 nm (rot) und die Leitfähigkeit (braun) sind auf der y-Achse dargestellt. Auf der x-Achse sind das Durchflussvolumen des Puffers ( $P_{300}/\beta$ -Mercaptoethanol) und die gesammelten Fraktionen (jeweils 5ml) aufgetragen.



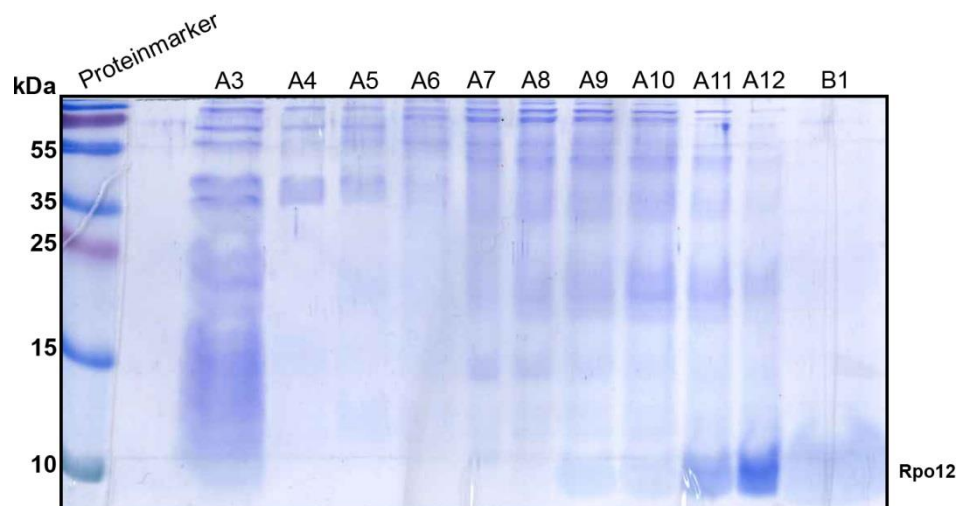
**Abbildung B.8.2:** 16%SDS-Gel, das die Elutionsfraktionen des Gelfiltrationslaufs mit Rpo10 zeigt. Die Fraktionen A1-B2 sind auf dem SDS-Gel aufgetragen. Die Fraktionen A9-B1 wurden mit Hilfe eines Konzentrators (Amicon Ultra-15, MWCO:3000 Da, Merck Millipore) konzentriert.



## B.9 Rpo12

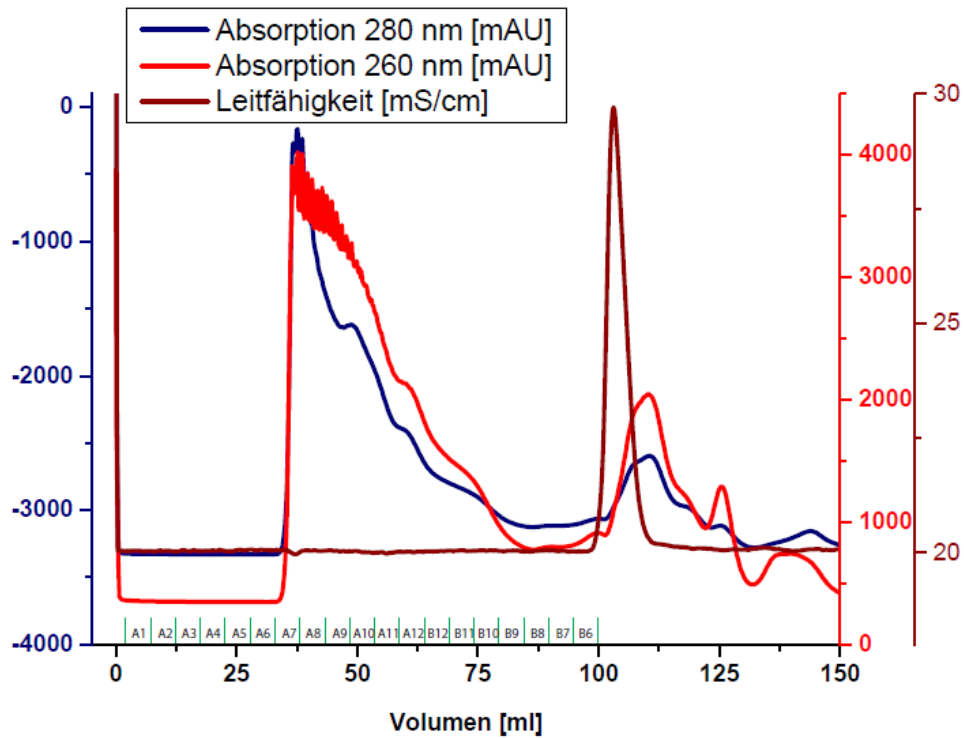


**Abbildung B.9.1:** FPLC-Chromatogramm des Rpo12-Gelfiltrationslaufs (HiPrep-Sephacryl, S-100 16/60). Die Absorptionen bei den Wellenlängen 280 nm (blau) und 260 nm (rot) und die Leitfähigkeit (braun) sind auf der y-Achse dargestellt. Auf der x-Achse sind das Durchflussvolumen des Puffers ( $P_{300}/\beta$ -Mercaptoethanol) und die gesammelten Fraktionen (jeweils 5 ml) aufgetragen.

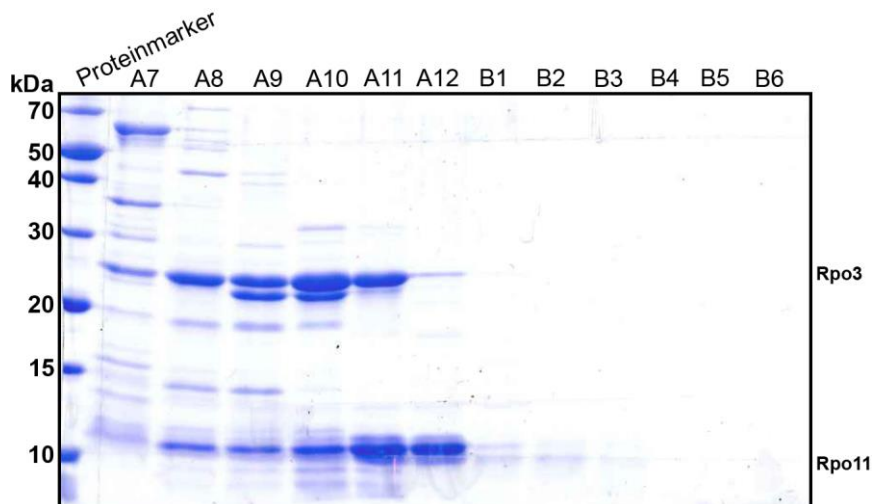


**Abbildung B.9.2:** 16%SDS-Gel, das die Elutionsfraktionen des Gelfiltrationslaufs mit Rpo12 zeigt. Die Fraktionen A3-B1 sind auf dem SDS-Gel aufgetragen. Die Fraktionen A11-B1 wurden mit Hilfe eines Konzentrators (Amicon Ultra-15, MWCO:3000 Da, Merck Millipore) konzentriert.

## B.10 Rpo3/11

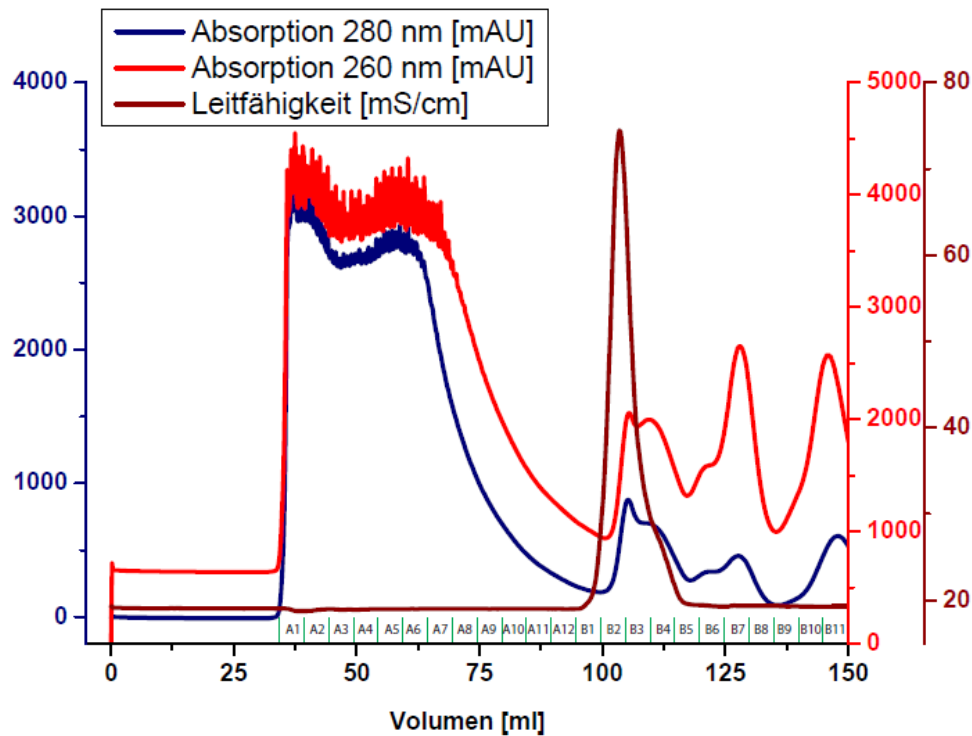


**Abbildung B.10.1:** FPLC-Chromatogramm des Rpo3/11-Gelfiltrationslaufs (HiPrep-Sephacryl, S-100 16/60). Die Absorptionen bei den Wellenlängen 280 nm (blau) und 260 nm (rot) und die Leitfähigkeit (braun) sind auf der y-Achse dargestellt. Auf der x-Achse sind das Durchflussvolumen des Puffers ( $P_{300}/\beta$ -Mercaptoethanol) und die gesammelten Fraktionen (jeweils 5 ml) aufgetragen.

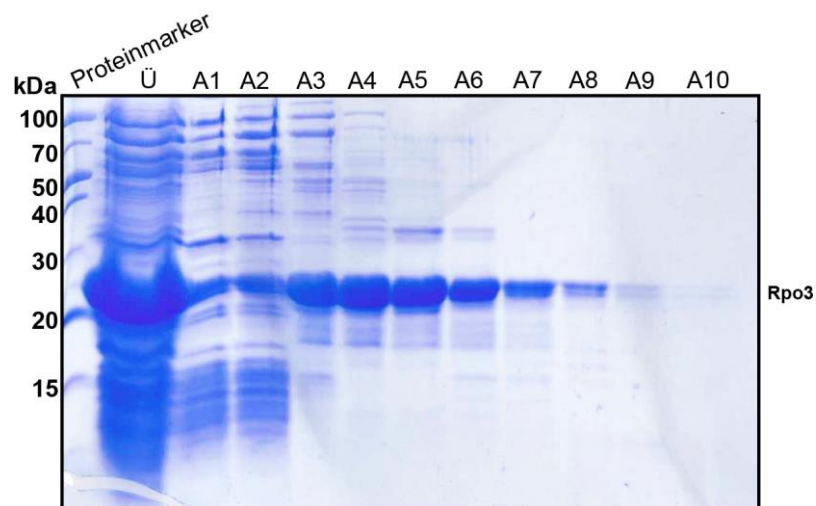


**Abbildung B.10.2:** 15% SDS-Gel, das die Elutionsfraktionen des Gelfiltrationslaufs mit Rpo3/11 zeigt. Die Fraktionen A7-B6 sind auf dem SDS-Gel aufgetragen und die Fraktionen A8-A11 wurden mit Hilfe des Konzentrators (Amicon Ultra-15, MWCO:3000 Da, Merck Millipore) konzentriert.

## B.11 Rpo3

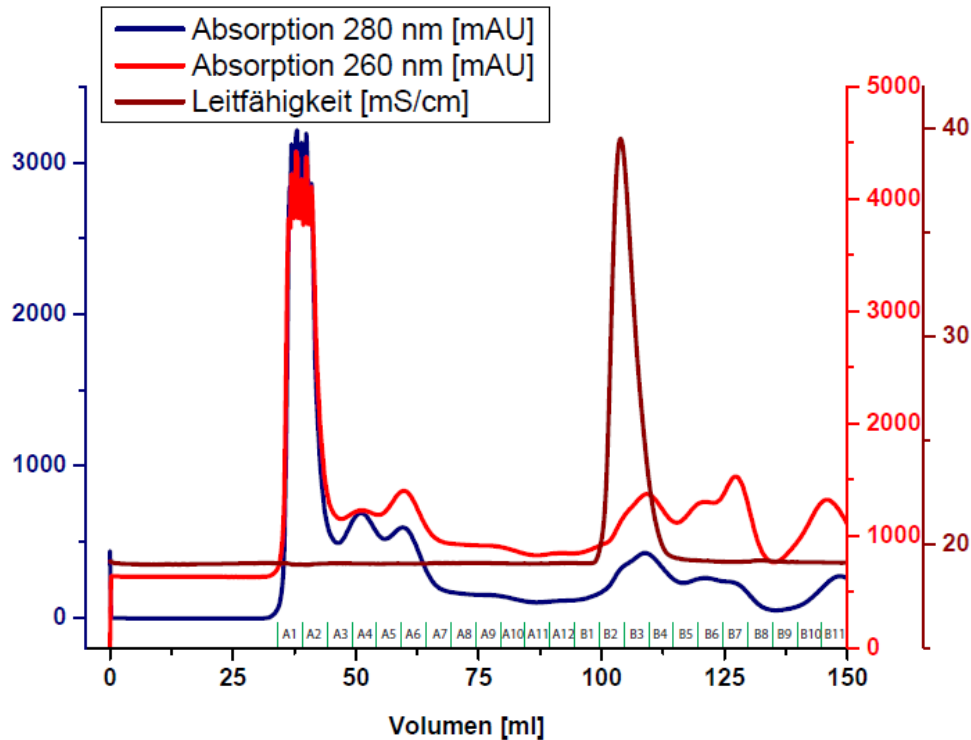


**Abbildung B.11.1:** FPLC-Chromatogramm des Rpo3-Gelfiltrationslaufs (HiPrep-Sephacryl, S-100 16/60). Die Absorptionen bei den Wellenlängen 280 nm (blau) und 260 nm (rot) und die Leitfähigkeit (braun) sind auf der y-Achse dargestellt. Auf der x-Achse sind das Durchflussvolumen des Puffers ( $P_{300}/\beta$ -Mercaptoethanol) und die gesammelten Fraktionen (jeweils 5 ml) aufgetragen.

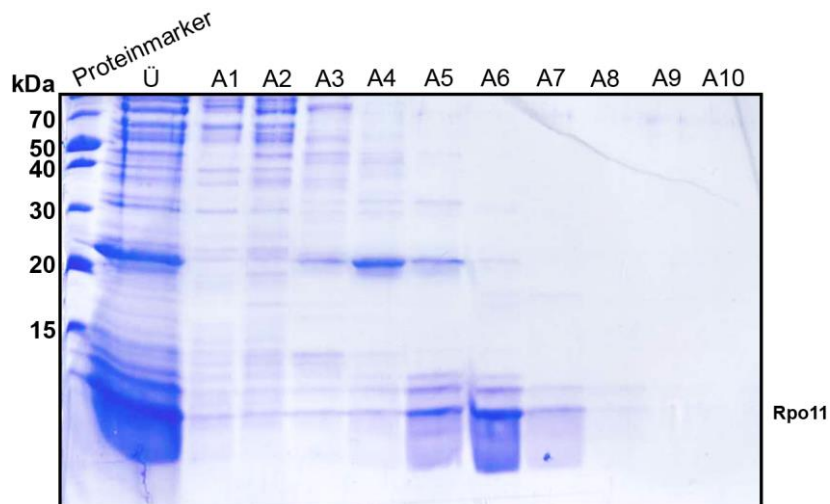


**Abbildung B.11.2:** 15%SDS-Gel das die Elutionsfraktionen des Gelfiltrationslaufs mit Rpo3 zeigt. Der Überstand und die Fraktionen A1-A10 sind auf dem SDS-Gel aufgetragen.

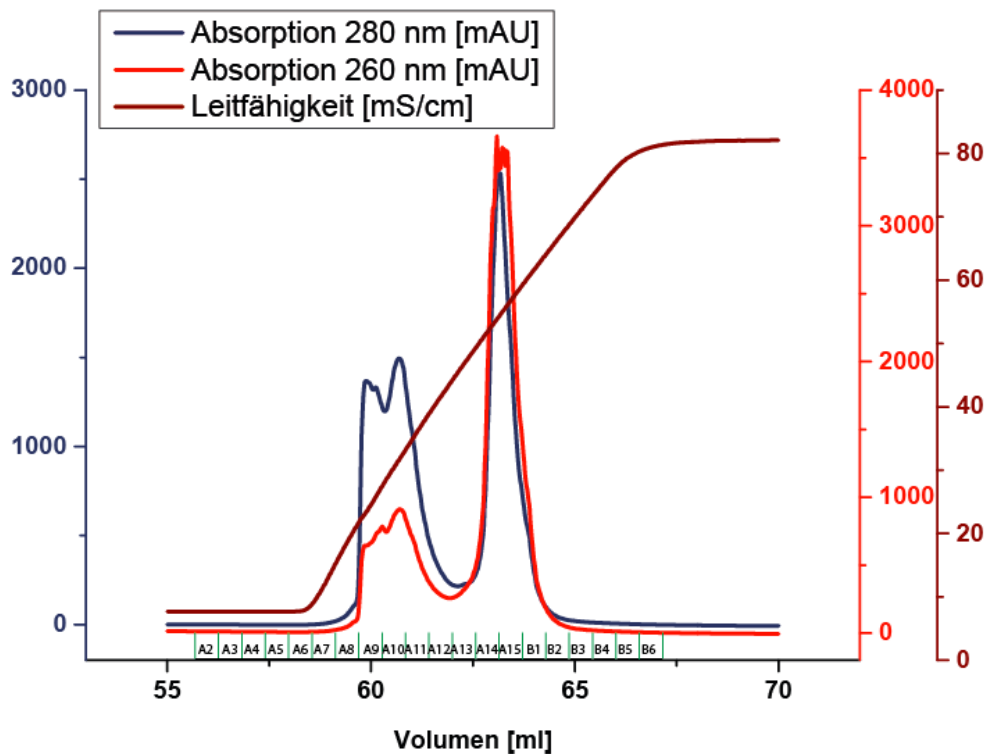
## B.12 Rpo11



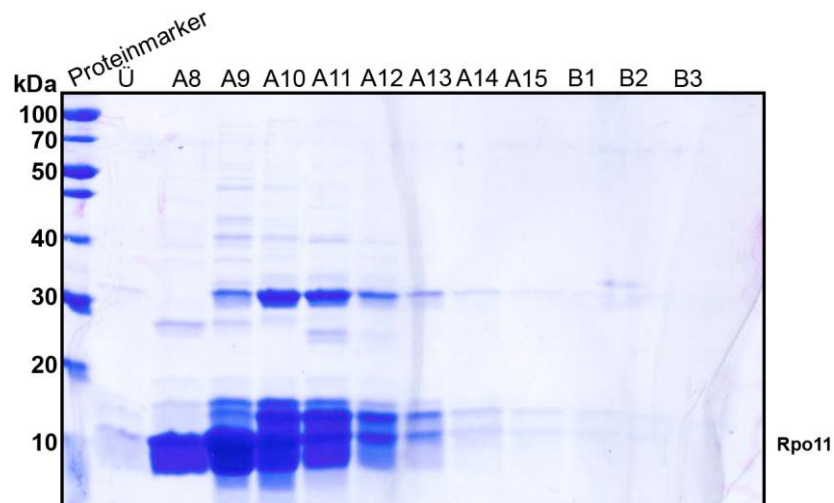
**Abbildung B.12.1:** FPLC-Chromatogramm des Rpo11-Gelfiltrationslaufs (HiPrep-Sephacryl, S-100 16/60). Die Absorptionen bei den Wellenlängen 280 nm (blau) und 260 nm (rot) und die Leitfähigkeit (braun) sind auf der y-Achse dargestellt. Auf der x-Achse sind das Durchflussvolumen des Puffers (P<sub>300</sub>/β-Mercaptoethanol) und die gesammelten Fraktionen (jeweils 5 ml) aufgetragen.



**Abbildung B.12.2:** 16%SDS-Gel, das die Elutionsfraktionen des Gelfiltrationslaufs mit Rpo11 zeigt. Der Überstand (Ü) und die Fraktionen A1-A10 sind auf dem SDS-Gel aufgetragen. Die Fraktionen A5-A7 wurden mit dem Puffer 50 mM Tris/HCl, pH 7.5; 50 mM NaCl verdünnt und einer weiteren Reinigung (Anionenaustauschchromatographie) unterzogen.

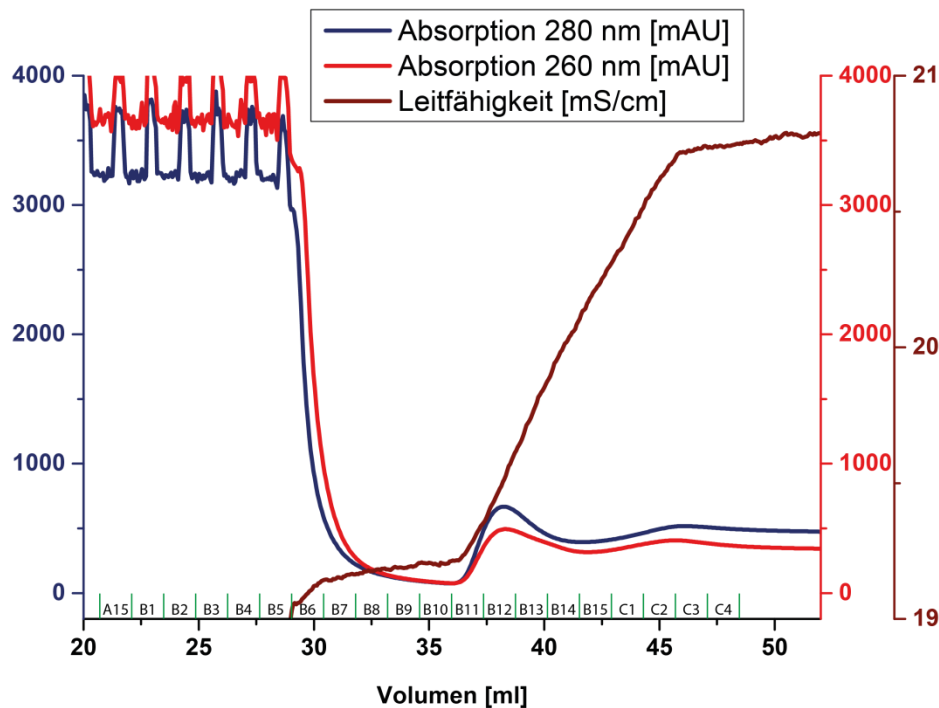


**Abbildung B.12.3:** FPLC-Chromatogramm des Rpo11-Anionenaustauscherchromatographielaufs (MonoQ 4,6/100 PE). Die Absorptionen bei den Wellenlängen 280 nm (blau) und 260 nm (rot) und die Leitfähigkeit (braun) sind auf der y-Achse dargestellt. Auf der x-Achse sind das Durchflussvolumen des Puffers (Puffer A: 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 50 mM NaCl; Puffer B: 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 1 M NaCl) und die gesammelten Fraktionen (jeweils 1 ml) aufgetragen.

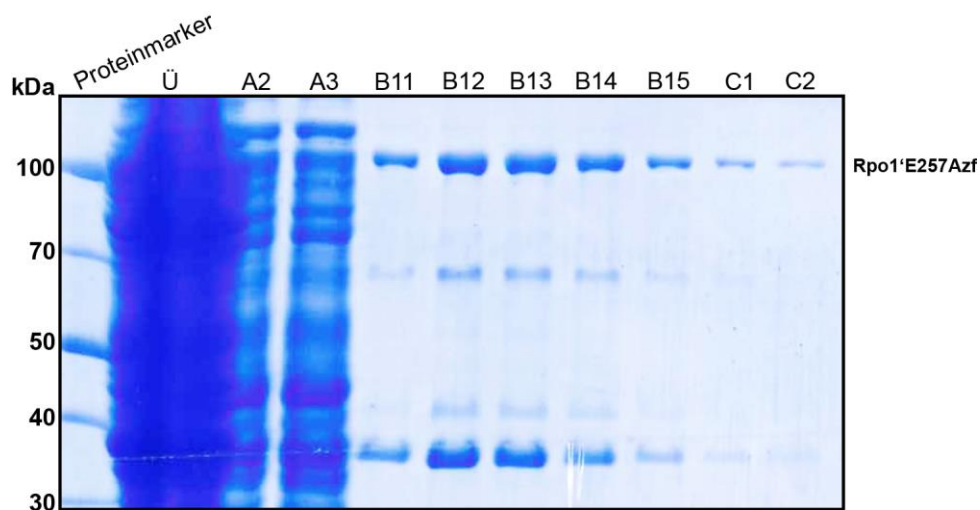


**Abbildung B.12.4:** 16%SDS-Gel, das die Elutionsfraktionen des Anionenaustauscherlaufs mit Rpo11 zeigt. Der Überstand (Ü) und die Fraktionen A8-B3 sind auf dem SDS-Gel aufgetragen. Die Fraktionen A8-A11 wurden gesammelt.

### B.13 Rpo1'E257Azf

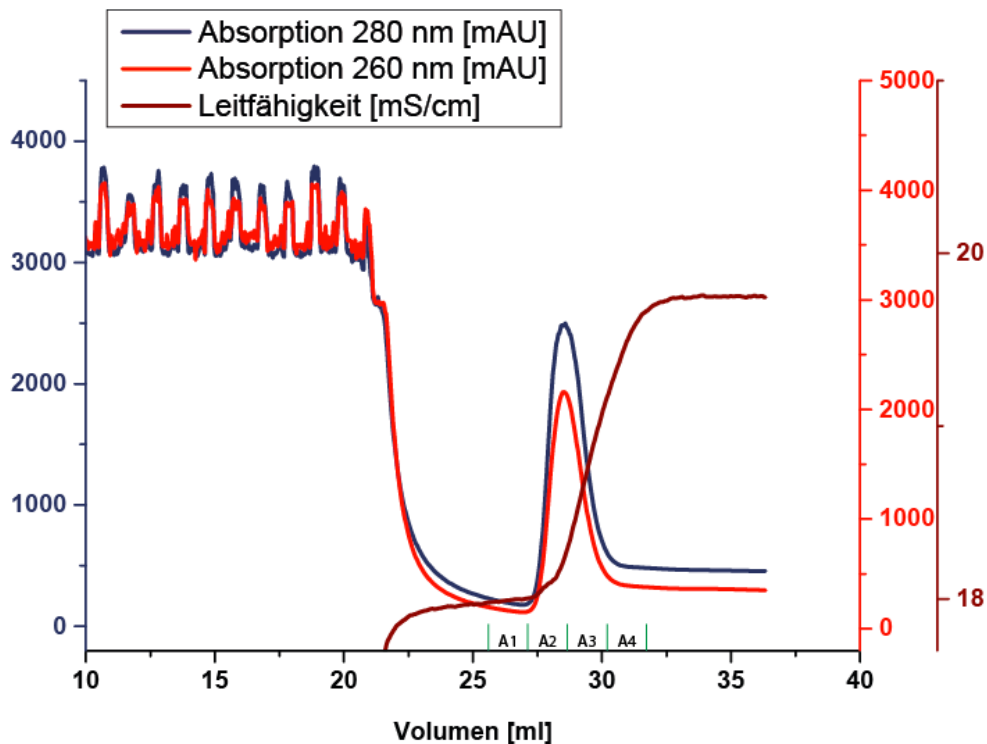


**Abbildung B.13.1:** FPLC-Chromatogramm des Affinitätschromatographielaufs für Rpo1'E257Azf (HisTrap FF 1ml). Die Absorptionen bei den Wellenlängen 280 nm (blau) und 260 nm (rot), sowie die Leitfähigkeit (braun) sind auf der y-Achse dargestellt. Auf der x-Achse sind das Durchflussvolumen des Puffers (Puffer A: 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 250 mM NaCl, 6 M Harnstoff, 20 mM Imidazol; Puffer B: 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 250 mM NaCl, 6 M Harnstoff, 250 mM Imidazol) und die gesammelten Fraktionen (jeweils 1 ml) aufgetragen.

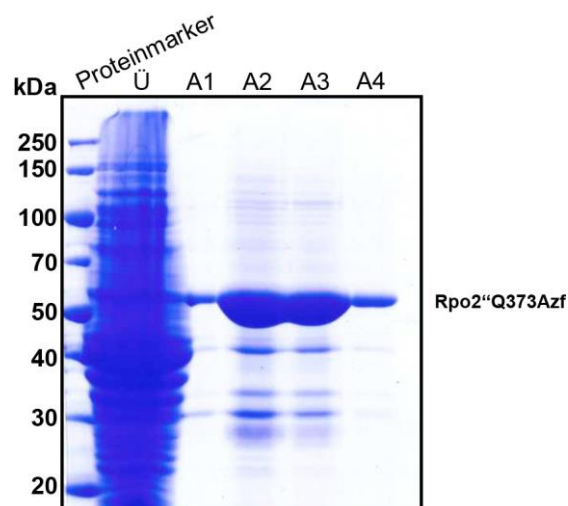


**Abbildung B.13.2:** 10%SDS-Gel, das die Elutionsfraktionen des Affinitätschromatographielaufs mit Rpo1'E257Azf zeigt. Der Überstand (Ü) und die Fraktionen A2, A3, B11-C2 sind auf dem SDS-Gel aufgetragen. Die Fraktionen B11-B15 enthalten das gewünschte Protein.

## B.14 Rpo2<sup>''</sup>Q373Azf



**Abbildung B.14.1:** FPLC-Chromatogramm des Affinitätschromatographielaufs für Rpo2<sup>''</sup>Q373Azf (HisTrap FF 1ml). Die Absorptionen bei den Wellenlängen 280 nm (blau) und 260 nm (rot) und die Leitfähigkeit des Puffers (braun) sind auf der y-Achse dargestellt. Auf der x-Achse sind das Durchflussvolumen des Puffers (Puffer A: 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 250 mM NaCl, 6 M Harnstoff, 20 mM Imidazol; Puffer B: 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 250 mM NaCl, 6 M Harnstoff, 250 mM Imidazol) und die gesammelten Fraktionen (jeweils 1 ml) aufgetragen.

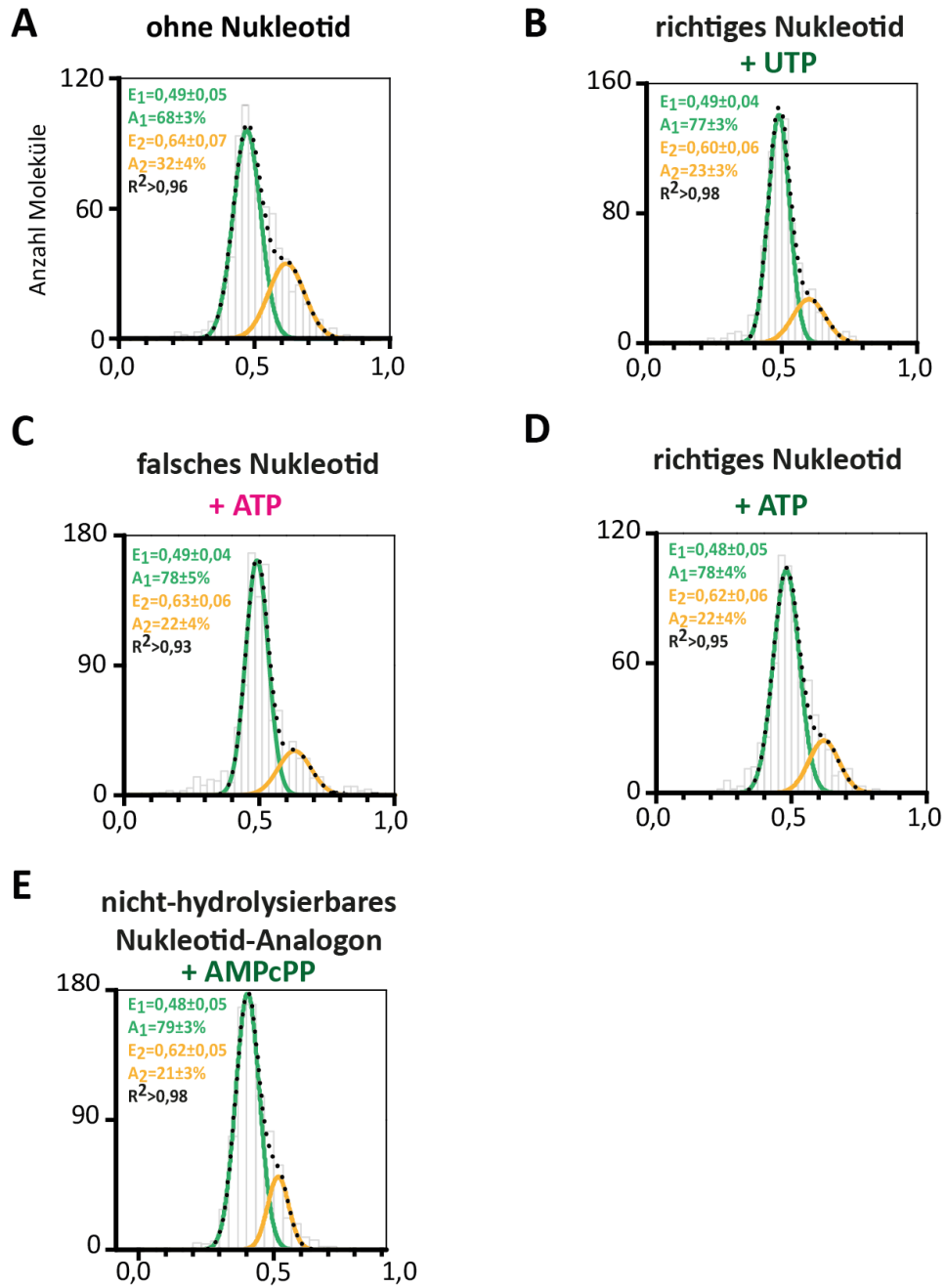


**Abbildung B.14.2:** 10%SDS-Gel, das die Elutionsfraktionen des Affinitätschromatographielaufs mit Rpo2<sup>''</sup>Q373Azf zeigt. Der Überstand (Ü) und die Fraktionen A1-A4 sind auf dem SDS-Gel aufgetragen. Die Fraktionen A2 und A3 enthalten das gewünschte Protein.

## Anhang C: Elongationskomplex mit RNAP $\Delta$ Rpo4/7

Die Zugabe des richtigen Nukleotids (UTP für RNA T40) resultierte in einer großen Hauptpopulation bei  $E_1=0,49 \pm 0,04$  ( $77 \pm 3\%$ ) und einer kleineren Nebenpopulation bei  $E_2=0,60 \pm 0,06$  ( $23 \pm 3\%$ ) (s. Abbildung C.1 (B)). Die Population bei FRET-Effizienz  $E_2$  nimmt somit um 9%, im Vergleich zur Messung ohne UTP, ab (s. Abbildung C.1 (A)). Inkubation des Elongationskomplexes mit dem falschen Nukleotid (ATP) führte zu einer Verteilung der Populationen bei den FRET-Effizienzen  $E_1=0,49 \pm 0,04$  ( $78 \pm 5\%$ ) und  $E_2=0,63 \pm 0,06$  ( $22 \pm 4\%$ ) (s. Abbildung C.1 (C)). Wurde der Elongationskomplex mit einem DNA/RNA-Hybrid gebildet, der die RNA T43 enthält und das richtige Nukleotid (ATP) zugegeben, führte dies ebenfalls zu einer Verringerung der  $E_2$ -Population um 10 % ( $E_1=0,48 \pm 0,05$  ( $78 \pm 4\%$ );  $E_2=0,62 \pm 0,06$  ( $22 \pm 4\%$ )) (s. Abbildung C.1(D)). Ein nicht-hydrolysierbares Nukleotid-Analogon AMPcPP enthält eine zusätzliche Alkylgruppe  $\text{CH}_2$  (s. Abbildung 4.10.5), sodass das Nukleotid zwar von der RNAP in der Nukleotid-Bindetasche positioniert werden, aber das Pyrophosphat nicht abgespalten werden kann und keine Verlängerung der wachsenden RNA möglich ist. Bei Verwendung von AMPcPP ergab sich eine Hauptpopulation bei  $E_1=0,48 \pm 0,05$  ( $79 \pm 3\%$ ) und einer Population mit verhältnismäßig geringem Anteil an Molekülen bei  $E_2=0,62 \pm 0,05$  ( $21 \pm 3\%$ ) (s. Abbildung C.1 (E)).



**RNAP  $\Delta$ Rpo4/7**

**Abbildung C.1:** FRET-Effizienz-Histogramme der doppelt markierten RNAP $\Delta$ Rpo4/7 im Elongationskomplex **(A)** in Anwesenheit des richtigen Nukleotids UTP bzw. ATP **(B)** und **(D)**, des falschen Nukleotids ATP **(C)** und eines nicht-hydrolysierbaren Nukleotid-Analogons AMPcPP **(E)**.

## Anhang D: Zusammenfassung der FRET-Messungen

Die Ergebnisse (Anzahl der Moleküle, FRET-Effizienz, relativer Anteil der Population) der durchgeführten und gezeigten FRET-Experimente sind in nachfolgender Tabelle zusammengefasst. Folgende Abkürzungen wurden verwendet:

ES=Elongationsscaffold (bestehend aus dem nicht-kodogenen, kodogenen Strang und RNA (T40))

nkS= nicht-kodogener Strang

	Probe	Anzahl der Moleküle	FRET Effizienz		Relativer Anteil	
			E <sub>1</sub>	E <sub>2</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>
Freie RNAP	RNAPΔRpo4/7	667	0,37 ± 0,1	0,66 ± 0,08	26 ± 4%	74 ± 5%
	RNAP wt	571	0,40 ± 0,1	0,67 ± 0,09	18 ± 3%	82 ± 3%
	RNAPΔRpo4/6/7	448	0,34 ± 0,1	0,69 ± 0,16	15 ± 7%	85 ± 10%
	RNAPΔRpo6	231	0,34 ± 0,1	0,69 ± 0,15	15 ± 7%	85 ± 10%
	RNAP wt + TFE	671		0,69 ± 0,08		100%
	RNAPΔRpo4/7 + TFE	220	0,44 ± 0,09	0,66 ± 0,07	31 ± 8%	69 ± 8%
	RNAP wt + Spt4/5	239		0,67 ± 0,08		100%
	RNAP wt + ES	551	0,51 ± 0,08	0,65 ± 0,07	55 ± 23%	45 ± 23%
	RNAPΔRpo4/7 + ES	348	0,48 ± 0,07	0,65 ± 0,07	51 ± 8%	49 ± 6%
Prä-Initiationskomplex	RNAP wt (homo-duplex)	1168	0,40 ± 0,05	0,63 ± 0,12	13 ± 2%	87 ± 3%
	RNAP wt + TFE (homo-duplex)	670	0,46 ± 0,05	0,65 ± 0,10	38 ± 7%	62 ± 8%
	RNAP wt (hetero-duplex)	1140	0,43 ± 0,06	0,62 ± 0,12	56 ± 2%	44 ± 2%
	RNAP wt (hetero-duplex) + TFE	1055	0,47 ± 0,04	0,62 ± 0,12	67 ± 2%	33 ± 4%
	RNAPΔRpo4/7 (heteroduplex)	943	0,40 ± 0,05	0,62 ± 0,12	54 ± 4%	46 ± 5%
	RNAPΔRpo4/7 (heteroduplex) + TFE	750	0,43 ± 0,05	0,62 ± 0,09	58% ± 2%	42 ± 3%
	RNAP wt (hetero-duplex) + GTP	229	0,41 ± 0,05	0,60 ± 0,08	53 ± 3%	47 ± 3%
Elongationskomplex	RNAP wt (T40)	493	0,51 ± 0,06	0,66 ± 0,06	71 ± 5%	29 ± 3%
	RNAPΔRpo4/7 (T40)	741	0,49 ± 0,05	0,64 ± 0,07	68 ± 3%	32 ± 4%
	RNAP wt (lange RNA)	745	0,49 ± 0,05	0,63 ± 0,06	69 ± 7%	31 ± 6%
	RNAPΔRpo4/7 (lange RNA)	819	0,48 ± 0,04	0,58 ± 0,06	63 ± 6%	37 ± 5%
	RNAP wt	479		0,62 ± 0,06		100%

	– nkS					
	RNAP wt + nkS	429	$0,52 \pm 0,04$	$0,63 \pm 0,05$	$72 \pm 3\%$	$28 \pm 4\%$
	RNAP wt + Spt4/5	305	$0,53 \pm 0,05$	$0,68 \pm 0,06$	$88 \pm 3\%$	$12 \pm 3\%$
	RNAP wt (T40) + UTP	713	$0,49 \pm 0,04$	$0,60 \pm 0,06$	$80 \pm 4\%$	$20 \pm 3\%$
	RNAP wt (lange RNA) + UTP	256	$0,49 \pm 0,05$	$0,62 \pm 0,06$	$86 \pm 4\%$	$14 \pm 4\%$
	RNAP wt (T40) + ATP	611	$0,50 \pm 0,06$	$0,62 \pm 0,06$	$72 \pm 7\%$	$28 \pm 6\%$
	RNAP wt (T43) + ATP	259	$0,48 \pm 0,05$	$0,62 \pm 0,06$	$86 \pm 4\%$	$14 \pm 3\%$
	RNAP wt (T43) + AMPcPP	292	$0,52 \pm 0,07$	$0,71 \pm 0,06$	$89 \pm 4\%$	$11 \pm 3\%$
	RNAPΔRpo4/7 + nkS	357	$0,49 \pm 0,04$	$0,59 \pm 0,06$	$71 \pm 3\%$	$29 \pm 2\%$
	RNAPΔRpo4/7 Farbstoffe ge- tauscht	915	$0,51 \pm 0,05$	$0,64 \pm 0,06$	$70 \pm 2\%$	$30 \pm 2\%$
	RNAP wt (T43)	481	$0,49 \pm 0,05$	$0,63 \pm 0,05$	$69 \pm 3\%$	$31 \pm 4\%$
	RNAPΔRpo4/7 (T40) + UTP	765	$0,49 \pm 0,04$	$0,60 \pm 0,06$	$77 \pm 3\%$	$23 \pm 3\%$
	RNAPΔRpo4/7 (T40) + ATP	969	$0,49 \pm 0,04$	$0,63 \pm 0,06$	$78 \pm 5\%$	$22 \pm 4\%$
	RNAPΔRpo4/7 (T43) + ATP	665	$0,48 \pm 0,05$	$0,62 \pm 0,06$	$78 \pm 4\%$	$22 \pm 4\%$
	RNAPΔRpo4/7 (T43) + AMPcPP	769	$0,48 \pm 0,05$	$0,62 \pm 0,05$	$79 \pm 3\%$	$21 \pm 3\%$

## Literaturverzeichnis

1. Dangkulwanich, M., et al., *Molecular mechanisms of transcription through single-molecule experiments*. Chemical reviews, 2014. **114**(6): p. 3203-23.
2. Weiss, S. and L. Gladstone, *A mammalian system for the incorporation of cytidine triphosphate into ribonucleic acid*. J. Am. Chem. Soc., 1959. **81**: p. 4118-4119.
3. Stevens, A., *Incorporation of the adenine ribonucleotide into RNA by cell fractions from E.coli*. B. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1960. **3**: p. 92-96.
4. Werner, F. and D. Grohmann, *Evolution of multisubunit RNA polymerases in the three domains of life*. Nature reviews. Microbiology, 2011. **9**(2): p. 85-98.
5. Decker, K.B. and D.M. Hinton, *Transcription regulation at the core: similarities among bacterial, archaeal, and eukaryotic RNA polymerases*. Annual review of microbiology, 2013. **67**: p. 113-39.
6. Sayre, M.H., H. Tschochner, and R.D. Kornberg, *Reconstitution of transcription with five purified initiation factors and RNA polymerase II from Saccharomyces cerevisiae*. The Journal of biological chemistry, 1992. **267**(32): p. 23376-82.
7. Borukhov, S. and E. Nudler, *RNA polymerase: the vehicle of transcription*. Trends in microbiology, 2008. **16**(3): p. 126-34.
8. Zhang, G., et al., *Crystal structure of Thermus aquaticus core RNA polymerase at 3.3 Å resolution*. Cell, 1999. **98**(6): p. 811-24.
9. Cramer, P., et al., *Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism*. Science, 2000. **288**(5466): p. 640-9.
10. Hirata, A., B.J. Klein, and K.S. Murakami, *The X-ray crystal structure of RNA polymerase from Archaea*. Nature, 2008. **451**(7180): p. 851-4.
11. Fu, J., et al., *Yeast RNA polymerase II at 5 Å resolution*. Cell, 1999. **98**(6): p. 799-810.
12. Chakraborty, A., et al., *Opening and closing of the bacterial RNA polymerase clamp*. Science, 2012. **337**(6094): p. 591-5.
13. Werner, F., *Structure and function of archaeal RNA polymerases*. Molecular microbiology, 2007. **65**(6): p. 1395-404.
14. Cramer, P., D.A. Bushnell, and R.D. Kornberg, *Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution*. Science, 2001. **292**(5523): p. 1863-76.
15. Gnatt, A.L., et al., *Structural basis of transcription: an RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution*. Science, 2001. **292**(5523): p. 1876-82.
16. Armache, K.J., et al., *Structures of complete RNA polymerase II and its subcomplex, Rpb4/7*. The Journal of biological chemistry, 2005. **280**(8): p. 7131-4.
17. Kettenberger, H., K.J. Armache, and P. Cramer, *Complete RNA polymerase II elongation complex structure and its interactions with NTP and TFIIIS*. Molecular Cell, 2004. **16**(6): p. 955-65.

18. Cramer, P., *Multisubunit RNA polymerases*. Current opinion in structural biology, 2002. **12**(1): p. 89-97.
19. Cramer, P., *Common structural features of nucleic acid polymerases*. BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology, 2002. **24**(8): p. 724-9.
20. Wang, D., et al., *Structural basis of transcription: role of the trigger loop in substrate specificity and catalysis*. Cell, 2006. **127**(5): p. 941-54.
21. Grohmann, D. and F. Werner, *Cycling through transcription with the RNA polymerase F/E (RPB4/7) complex: structure, function and evolution of archaeal RNA polymerase*. Research in microbiology, 2011. **162**(1): p. 10-8.
22. Grohmann, D., et al., *The initiation factor TFE and the elongation factor Spt4/5 compete for the RNAP clamp during transcription initiation and elongation*. Molecular Cell, 2011. **43**(2): p. 263-74.
23. Duttke, S.H., *Evolution and diversification of the basal transcription machinery*. Trends in biochemical sciences, 2015. **40**(3): p. 127-9.
24. Arthur, T.M. and R.R. Burgess, *Localization of a sigma70 binding site on the N terminus of the Escherichia coli RNA polymerase beta' subunit*. The Journal of biological chemistry, 1998. **273**(47): p. 31381-7.
25. Grunberg, S., L. Warfield, and S. Hahn, *Architecture of the RNA polymerase II preinitiation complex and mechanism of ATP-dependent promoter opening*. Nature structural & molecular biology, 2012. **19**(8): p. 788-96.
26. Weinzierl, R.O., *The RNA polymerase factory and archaeal transcription*. Chemical reviews, 2013. **113**(11): p. 8350-76.
27. Stryer, L. and R.P. Haugland, *Energy transfer: a spectroscopic ruler*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1967. **58**(2): p. 719-26.
28. Gust, A., et al., *A starting point for fluorescence-based single-molecule measurements in biomolecular research*. Molecules, 2014. **19**(10): p. 15824-65.
29. Weiss, S., *Fluorescence spectroscopy of single biomolecules*. Science, 1999. **283**(5408): p. 1676-83.
30. Werner, F. and R.O. Weinzierl, *A recombinant RNA polymerase II-like enzyme capable of promoter-specific transcription*. Molecular Cell, 2002. **10**(3): p. 635-46.
31. Bult, C.J., et al., *Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, Methanococcus jannaschii*. Science, 1996. **273**(5278): p. 1058-73.
32. Thomas, M.C. and C.M. Chiang, *The general transcription machinery and general cofactors*. Critical reviews in biochemistry and molecular biology, 2006. **41**(3): p. 105-78.
33. Vannini, A. and P. Cramer, *Conservation between the RNA polymerase I, II, and III transcription initiation machineries*. Molecular Cell, 2012. **45**(4): p. 439-46.
34. Werner, F., *Structural evolution of multisubunit RNA polymerases*. Trends in microbiology, 2008. **16**(6): p. 247-50.
35. Naji, S., S. Grunberg, and M. Thomm, *The RPB7 orthologue E' is required for transcriptional activity of a reconstituted archaeal core enzyme at low temperatures and stimulates open complex formation*. The Journal of biological chemistry, 2007. **282**(15): p. 11047-57.

36. Werner, F. and R.O. Weinzierl, *Direct modulation of RNA polymerase core functions by basal transcription factors*. Molecular and cellular biology, 2005. **25**(18): p. 8344-55.
37. Grohmann, D., et al., *RNA-binding to archaeal RNA polymerase subunits F/E: a DEER and FRET study*. Journal of the American Chemical Society, 2010. **132**(17): p. 5954-5.
38. Hirtreiter, A., D. Grohmann, and F. Werner, *Molecular mechanisms of RNA polymerase--the F/E (RPB4/7) complex is required for high processivity in vitro*. Nucleic Acids Research, 2010. **38**(2): p. 585-96.
39. Tan, L., et al., *Bridge helix and trigger loop perturbations generate superactive RNA polymerases*. Journal of biology, 2008. **7**(10): p. 40.
40. Bar-Nahum, G., et al., *A ratchet mechanism of transcription elongation and its control*. Cell, 2005. **120**(2): p. 183-93.
41. Brueckner, F., J. Ortiz, and P. Cramer, *A movie of the RNA polymerase nucleotide addition cycle*. Current opinion in structural biology, 2009. **19**(3): p. 294-9.
42. Grohmann, D., A. Hirtreiter, and F. Werner, *RNAP subunits F/E (RPB4/7) are stably associated with archaeal RNA polymerase: using fluorescence anisotropy to monitor RNAP assembly in vitro*. The Biochemical journal, 2009. **421**(3): p. 339-43.
43. Hirtreiter, A., et al., *Spt4/5 stimulates transcription elongation through the RNA polymerase clamp coiled-coil motif*. Nucleic Acids Research, 2010. **38**(12): p. 4040-51.
44. Werner, F., *Molecular mechanisms of transcription elongation in archaea*. Chemical reviews, 2013. **113**(11): p. 8331-49.
45. Armache, K.J., H. Kettenberger, and P. Cramer, *Architecture of initiation-competent 12-subunit RNA polymerase II*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(12): p. 6964-8.
46. Jun, S.H., et al., *The X-ray crystal structure of the euryarchaeal RNA polymerase in an open-clamp configuration*. Nature Communications, 2014. **5**: p. 5132.
47. He, Y., et al., *Structural visualization of key steps in human transcription initiation*. Nature, 2013. **495**(7442): p. 481-6.
48. Plaschka, C., et al., *Architecture of the RNA polymerase II-Mediator core initiation complex*. Nature, 2015. **518**(7539): p. 376-80.
49. Nagy, J., et al., *Complete architecture of the archaeal RNA polymerase open complex from single-molecule FRET and NPS*. Nature Communications, 2015. **6**: p. 6161.
50. Klein, B.J., et al., *RNA polymerase and transcription elongation factor Spt4/5 complex structure*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011. **108**(2): p. 546-50.
51. Martinez-Rucobo, F.W., et al., *Architecture of the RNA polymerase-Spt4/5 complex and basis of universal transcription processivity*. The EMBO journal, 2011. **30**(7): p. 1302-10.
52. Hartzog, G.A. and C.D. Kaplan, *Competing for the clamp: promoting RNA polymerase processivity and managing the transition from initiation to elongation*. Molecular Cell, 2011. **43**(2): p. 161-3.
53. Magill, C.P., S.P. Jackson, and S.D. Bell, *Identification of a conserved archaeal RNA polymerase subunit contacted by the basal transcription*

- factor TFB*. The Journal of biological chemistry, 2001. **276**(50): p. 46693-6.
54. Wettach, J., et al., *Functional interaction of yeast and human TATA-binding proteins with an archaeal RNA polymerase and promoter*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995. **92**(2): p. 472-6.
  55. Gietl, A., et al., *Eukaryotic and archaeal TBP and TFB/TF(II)B follow different promoter DNA bending pathways*. Nucleic Acids Research, 2014. **42**(10): p. 6219-31.
  56. Kim, Y., et al., *Crystal structure of a yeast TBP/TATA-box complex*. Nature, 1993. **365**(6446): p. 512-20.
  57. Kosa, P.F., et al., *The 2.1-A crystal structure of an archaeal preinitiation complex: TATA-box-binding protein/transcription factor (II)B core/TATA-box*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997. **94**(12): p. 6042-7.
  58. Baumann, P., S.A. Qureshi, and S.P. Jackson, *Transcription: new insights from studies on Archaea*. Trends in genetics : TIG, 1995. **11**(7): p. 279-83.
  59. Blair, R.H., J.A. Goodrich, and J.F. Kugel, *Single-molecule fluorescence resonance energy transfer shows uniformity in TATA binding protein-induced DNA bending and heterogeneity in bending kinetics*. Biochemistry, 2012. **51**(38): p. 7444-55.
  60. Jun, S.H., et al., *Archaeal RNA polymerase and transcription regulation*. Critical reviews in biochemistry and molecular biology, 2011. **46**(1): p. 27-40.
  61. Grunberg, S., et al., *Transcription factor E is a part of transcription elongation complexes*. The Journal of biological chemistry, 2007. **282**(49): p. 35482-90.
  62. Schulz, S., et al., *Fluorescently labeled recombinant RNAP system to probe archaeal transcription initiation*. Methods, 2015. **86**: p. 10-18.
  63. Yakhnin, A.V. and P. Babitzke, *NusG/Spt5: are there common functions of this ubiquitous transcription elongation factor?* Current opinion in microbiology, 2014. **18**: p. 68-71.
  64. Werner, F., *A nexus for gene expression-molecular mechanisms of Spt5 and NusG in the three domains of life*. Journal of molecular biology, 2012. **417**(1-2): p. 13-27.
  65. Bell, S.D., et al., *Orientation of the transcription preinitiation complex in archaea*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(24): p. 13662-7.
  66. Kapanidis, A.N., et al., *Initial transcription by RNA polymerase proceeds through a DNA-scrunching mechanism*. Science, 2006. **314**(5802): p. 1144-7.
  67. Goldman, S.R., R.H. Ebright, and B.E. Nickels, *Direct detection of abortive RNA transcripts in vivo*. Science, 2009. **324**(5929): p. 927-8.
  68. Spitalny, P. and M. Thomm, *Analysis of the open region and of DNA-protein contacts of archaeal RNA polymerase transcription complexes during transition from initiation to elongation*. The Journal of biological chemistry, 2003. **278**(33): p. 30497-505.
  69. Steitz, T.A., *A mechanism for all polymerases*. Nature, 1998. **391**(6664): p. 231-2.

70. Andrecka, J., et al., *Single-molecule tracking of mRNA exiting from RNA polymerase II*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008. **105**(1): p. 135-40.
71. Kireeva, M.L., et al., *The 8-nucleotide-long RNA:DNA hybrid is a primary stability determinant of the RNA polymerase II elongation complex*. The Journal of biological chemistry, 2000. **275**(9): p. 6530-6.
72. Landick, R., *RNA polymerase clamps down*. Cell, 2001. **105**(5): p. 567-70.
73. Santangelo, T.J., et al., *Archaeal intrinsic transcription termination in vivo*. Journal of bacteriology, 2009. **191**(22): p. 7102-8.
74. Wang, L., et al., *Expanding the genetic code of Escherichia coli*. Science, 2001. **292**(5516): p. 498-500.
75. Liu, C.C. and P.G. Schultz, *Adding new chemistries to the genetic code*. Annual review of biochemistry, 2010. **79**: p. 413-44.
76. Chin, J.W., et al., *Addition of p-azido-L-phenylalanine to the genetic code of Escherichia coli*. Journal of the American Chemical Society, 2002. **124**(31): p. 9026-7.
77. Wang, K., et al., *Evolved orthogonal ribosomes enhance the efficiency of synthetic genetic code expansion*. Nature biotechnology, 2007. **25**(7): p. 770-7.
78. Joo, C. and T. Ha, *Single-molecule FRET with total internal reflection microscopy*. Cold Spring Harbor protocols, 2012. **2012**(12).
79. Kohn, M. and R. Breinbauer, *The Staudinger ligation-a gift to chemical biology*. Angewandte Chemie, 2004. **43**(24): p. 3106-16.
80. Chakraborty, A., et al., *Azide-specific labeling of biomolecules by Staudinger-Bertozzi ligation phosphine derivatives of fluorescent probes suitable for single-molecule fluorescence spectroscopy*. Methods in enzymology, 2010. **472**: p. 19-30.
81. van de Linde, S. and M. Sauer, *How to switch a fluorophore: from undesired blinking to controlled photoswitching*. Chemical Society reviews, 2014. **43**(4): p. 1076-87.
82. Rasnik, I., S.A. McKinney, and T. Ha, *Nonblinking and long-lasting single-molecule fluorescence imaging*. Nature Methods, 2006. **3**(11): p. 891-3.
83. Vogelsang, J., et al., *Ein System aus Reduktions-und Oxidationsmittel verringert Photobleichen und Blinken von Fluoreszenzfarbstoffen*. Angewandte Chemie, 2008. **120**: p. 5545-5550.
84. Aitken, C.E., R.A. Marshall, and J.D. Puglisi, *An oxygen scavenging system for improvement of dye stability in single-molecule fluorescence experiments*. Biophysical journal, 2008. **94**(5): p. 1826-35.
85. Benesch, R.E. and R. Benesch, *Enzymatic removal of oxygen for polarography and related methods*. Science, 1953. **118**(3068): p. 447-8.
86. Roy, R., S. Hohng, and T. Ha, *A practical guide to single-molecule FRET*. Nature Methods, 2008. **5**(6): p. 507-16.
87. Cordes, T., J. Vogelsang, and P. Tinnefeld, *On the mechanism of Trolox as antiblinking and antibleaching reagent*. Journal of the American Chemical Society, 2009. **131**(14): p. 5018-9.
88. Vogelsang, J., et al., *A reducing and oxidizing system minimizes photobleaching and blinking of fluorescent dyes*. Angewandte Chemie, 2008. **47**(29): p. 5465-9.



89. Selenyi, P., *Wide-Angle Interferences and the Nature of the Elementary Light Sources*. Phys.Rev, 1939. **56**: p. 477.
90. Valeur, B., *Molecular Fluorescence: Principles and Applications* 2002, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH.
91. Lakowicz, J.R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Third Edition ed 2006: Springer Science+Business Media, LLC.
92. Förster, T., *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz*. Annalen der Physik, 1948. **77**: p. 55-75.
93. Juette, M.F., et al., *The bright future of single-molecule fluorescence imaging*. Current opinion in chemical biology, 2014. **20**: p. 103-11.
94. Dale, R.E., J. Eisinger, and W.E. Blumberg, *The orientational freedom of molecular probes. The orientation factor in intramolecular energy transfer*. Biophysical journal, 1979. **26**(2): p. 161-93.
95. Piston, D.W. and G.J. Kremers, *Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly*. Trends in biochemical sciences, 2007. **32**(9): p. 407-14.
96. Qureshi, S.A. and S.P. Jackson, *Sequence-specific DNA binding by the *S. shibatae* TFIIIB homolog, TFB, and its effect on promoter strength*. Molecular Cell, 1998. **1**(3): p. 389-400.
97. 27.08.2015]; Available from: [https://www.attotec.com/attotecshop/product\\_info.php?language=en&info=p102\\_ATT0-532.html](https://www.attotec.com/attotecshop/product_info.php?language=en&info=p102_ATT0-532.html).
98. Santoso, Y., et al., *Red light, green light: probing single molecules using alternating-laser excitation*. Biochemical Society transactions, 2008. **36**(Pt 4): p. 738-44.
99. Eloranta, J.J., et al., *In vitro assembly of an archaeal D-L-N RNA polymerase subunit complex reveals a eukaryote-like structural arrangement*. Nucleic Acids Research, 1998. **26**(24): p. 5562-7.
100. Schulz, S., et al., *TFE and Spt4/5 open and close the RNA polymerase clamp during the transcription cycle*. PNAS, 2016. **113**(13): p. 1816-25.
101. McCann, J.J., et al., *Optimizing methods to recover absolute FRET efficiency from immobilized single molecules*. Biophysical journal, 2010. **99**(3): p. 961-70.
102. Sindbert, S., et al., *Accurate distance determination of nucleic acids via Förster resonance energy transfer: implications of dye linker length and rigidity*. Journal of the American Chemical Society, 2011. **133**(8): p. 2463-80.
103. Kostek, S.A., et al., *Molecular architecture and conformational flexibility of human RNA polymerase II*. Structure, 2006. **14**(11): p. 1691-700.
104. Mukhopadhyay, J., et al., *The RNA polymerase "switch region" is a target for inhibitors*. Cell, 2008. **135**(2): p. 295-307.
105. Sevostyanova, A., et al., *The beta subunit gate loop is required for RNA polymerase modification by RfaH and NusG*. Molecular Cell, 2011. **43**(2): p. 253-62.
106. Murakami, K., et al., *Architecture of an RNA polymerase II transcription pre-initiation complex*. Science, 2013. **342**(6159): p. 1238724.
107. Forget, D. and B. Coulombe, *Site-specific protein-DNA photocross-linking of purified complexes: topology of the RNA polymerase II transcription initiation complex*. Methods in enzymology, 2003. **370**: p. 701-12.

108. Geiger, S.R., et al., *RNA polymerase I contains a TFIIF-related DNA-binding subcomplex*. Molecular Cell, 2010. **39**(4): p. 583-94.
109. Chen, H.T., L. Warfield, and S. Hahn, *The positions of TFIIF and TFIIIE in the RNA polymerase II transcription preinitiation complex*. Nature structural & molecular biology, 2007. **14**(8): p. 696-703.
110. Treutlein, B., et al., *Dynamic architecture of a minimal RNA polymerase II open promoter complex*. Molecular Cell, 2012. **46**(2): p. 136-46.
111. Revyakin, A., et al., *Abortive initiation and productive initiation by RNA polymerase involve DNA scrunching*. Science, 2006. **314**(5802): p. 1139-43.
112. Kireeva, M.L., N. Komissarova, and M. Kashlev, *Overextended RNA:DNA hybrid as a negative regulator of RNA polymerase II processivity*. Journal of molecular biology, 2000. **299**(2): p. 325-35.
113. Engel, C., et al., *RNA polymerase I structure and transcription regulation*. Nature, 2013. **502**(7473): p. 650-5.
114. Weixlbaumer, A., et al., *Structural basis of transcriptional pausing in bacteria*. Cell, 2013. **152**(3): p. 431-41.
115. Guo, G., et al., *Structural and biochemical insights into the DNA-binding mode of MjSpt4p:Spt5 complex at the exit tunnel of RNAPII*. Journal of structural biology, 2015.

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1.1:** **(A)** Der Einbau der unnatürlichen Aminosäure in die RNAP Untereinheiten Rpo1' und Rpo2'' erfolgt mit Hilfe der *nonsense-suppression* Strategie. Die ortsspezifische Integration des Stopp-Codons TAG in die Gensequenz des Proteins und anschließende Koexpression mit dem Plasmid, das eine orthogonale Aminoacyl-tRNA Synthetase und die passende tRNA enthält, führt zum Vollängenprodukt des Proteins. Die unnatürliche Aminosäure kann spezifisch via Staudinger-Ligation mit Fluorophoren markiert werden. Für die Herstellung einer dreifach markierten RNAP, wird die Untereinheit Rpo11 über das natürlich vorkommende Cystein mit einem Biotin gekoppelt. Die Faltung der vollständigen RNAP erfolgt über die Assemblierung der einzelnen zwölf Untereinheiten, das einem denaturierenden-renaturierendem Protokoll folgt [30] **(B)** Die korrekt assemblierten RNAPs können anschließend auf Einzelmolekülebene untersucht und die Bewegung der RNAP Clamp über Bestimmung der FRET-Effizienzen verfolgt werden. **(C)** Darstellung der einzelnen FRET-Effizienzen in einem Histogramm, aus dem die mittleren FRET-Effizienzen sowie die Verteilung der Populationen ausgelesen werden können. .... 13
- Abbildung 2.1.1:** Gezeigt ist die Kristallstruktur der bakteriellen RNAP (*Thermus aquaticus*; PDB: 1I6V), der archaeellen RNAP (*Sulfolobus shibatae*; PDB: 2WAQ) und die der eukaryotischen RNAP (*Saccharomyces cerevisiae*; PDB: 1WCM). Die Clamp ist eine flexible Domäne innerhalb der RNAP und ist in allen drei Domänen des Lebens konserviert. .... 16
- Abbildung 2.1.2:** Zusammensetzung der RNA Polymerase (*Saccharomyces cerevisiae*; PDB: 1I50) aus den vier flexiblen Elementen: Clamp (rot), *shelf*- (violett), *jaw-lobe*-(gelb) und *core-module* (grau)..... 16
- Abbildung 2.1.3:** Kristallstrukturen der RNA Polymerasen aus *Saccharomyces cerevisiae* bestehend aus **(A)** 10 Untereinheiten (PDB: 1I50) und **(B)** 12 Untereinheiten (PDB: 1WCM). Der Abstand zwischen der Clamp und der dazu gegenüberliegenden Seite wird durch die Untereinheiten Rbp4/7 beeinflusst und verringert sich von 6,4 nm auf 4,4 nm. Die markierten Aminosäurepositionen sind in Rbp1: H282 (rot) und in Rbp2: T435 (grün)..... 18
- Abbildung 2.1.4:** Kristallstruktur der RNA Polymerase aus *Sulfolobus shibatae* (PDB:2WAQ). Die Faktoren TFE und Spt4/5 interagieren beide mit der Spitze der RNAP Clamp..... 19
- Abbildung 2.1.5:** Transkriptionsfaktoren. **(A)** Kristallstruktur von TBP aus *Methanocaldococcus jannaschii* (PDB: 2Z8U) **(B)** Das Homologiemodell von TFB aus *Methanocaldococcus jannaschii* basierend auf der TBP-TATA-TFB Struktur aus *Pyrococcus woesei* (PDB: 1D3U) und der TFIIIB-Kristallstruktur aus *Saccharomyces cerevisiae* (PDB: 4BBR) **(C)** Das Homologiemodell von TFE aus *Methanocaldococcus jannaschii*, das auf der Kristallstruktur der N-terminalen Domäne von TFE aus *Sulfolobus solfataricus* (PDB: 1Q1H) und auf der NMR-Struktur des humanen TFIIIE $_{\alpha}$  (PDB: 1VD4) basiert (Homologiemodell wurde in [22] gezeigt) **(D)** Kristallstruktur von Spt4/5 aus *Pyrococcus furiosus* (PDB: 3P8B).....21
- Abbildung 2.1.6:** Der Transkriptionszyklus besteht aus drei Phasen: Initiation, Elongation und Termination. Zunächst wird die RNAP auf die Promoter-DNA durch die Transkriptionsfaktoren TBP und TFB rekrutiert, wobei die

DNA vom geschlossenen zum offenen Komplex übergeht. Dieser wird von TFE weiter stabilisiert. In der Elongationsphase kommt es zum Transkriptionsfaktorwechsel: TFE wird von Spt4/5 verdrängt. Spt4/5 erhöht die Prozessivität der RNAP und verringert das Pausieren der RNAP. Im letzten Schritt, der Termination, dissoziiert die RNAP und die RNA wird freigesetzt. ....	22
<b>Abbildung 2.1.7:</b> Mechanismus der RNA Polymerisation. Über eine Substitutionsreaktion zwischen der 3'-OH-Gruppe der RNA und des Nukleotides (NTP) und der anschließenden Stabilisierung des Zwischenprodukts durch die Magnesium-Ionen, wird das Pyrophosphat abgespalten, sodass sich eine Phosphodiester-Bindung bildet. ....	24
<b>Abbildung 2.3.1:</b> (A) Cystein-Maleimid-Reaktion (B) Staudinger-Ligation. Das Protein ist jeweils lila dargestellt, während das Biotin und der Fluorophor als blauer bzw. grüner Kreis gekennzeichnet sind. ....	27
<b>Abbildung 2.4.1:</b> Vereinfachtes Jablonski-Diagramm. Dargestellt sind die Singulett ( $S_0$ , $S_1$ , $S_2$ )-, Triplett ( $T_1$ )- und die Radikalzustände eines Fluorophors ( $F^+$ , $F^{*+}$ ) sowie die einzelnen Übergänge mit den jeweiligen Raten $k$ . ....	28
<b>Abbildung 2.4.2:</b> Schematischer Aufbau zur Messung der Fluoreszenzanisotropie (verändert nach [91]). Das Anregungslicht wird durch den Polarisator linear polarisiert und passiert den Probenraum, der die fluoreszierende Probe enthält. Die vertikale bzw. horizontale Polarisation des Emissionslichts kann mit Hilfe eines Monochromators detektiert werden. ....	32
<b>Abbildung 2.4.3:</b> Vereinfachtes Termschema für FRET. Wird ein Molekül (Donor) infolge von Lichtabsorption angeregt ( $S_1$ -Zustand), so kann die Energie anstatt von Fluoreszenz strahlungslos an ein benachbartes Molekül (Akzeptor) übertragen werden, welches dann ein Photon aussenden kann. ....	33
<b>Abbildung 2.4.4:</b> Abhängigkeit der FRET-Effizienz vom Abstand des Donor-Akzeptor-Paares. Gezeigt ist die Abstandsabhängigkeit für das in der Arbeit verwendete Donor-Akzeptor-Paar DyLight 550 und DyLight 650 (Förster-Radius $R_0=5,2$ nm). ....	33
<b>Abbildung 2.4.5:</b> Schematische Darstellung der Abhängigkeit des Dipolorientierungsfaktors $\kappa^2$ von der Orientierung zwischen dem Emissionsdipol des Donors (grün) und dem Absorptionsdipol des Akzeptors (rot). $R$ ist der Abstand zwischen den beiden Dipolen. Liegen die beiden Dipole in einer Richtung kollinear, so ist $\kappa^2=4$ . Für parallele Dipole ist $\kappa^2=1$ und liegen die Dipole senkrecht zueinander, so nimmt $\kappa^2$ den Wert 0 an (verändert nach [91]). ....	34
<b>Abbildung 2.4.6:</b> Graphische Darstellung des spektralen Überlapps (grau) zwischen dem Emissionsspektrum des Donorfluorophors DyLight 550 (grün) und dem Absorptionsspektrum des Akzeptorfluorophors DyLight 650 (rot). ....	35
<b>Abbildung 2.4.7:</b> An der Grenzfläche zwischen Glasoberfläche mit höherem Brechungsindex $n_1$ und dem wässrigen Puffer mit dem niedrigeren Brechungsindex $n_2$ bildet sich unter Totalreflexion $\alpha$ ein evaneszentes Feld aus, das exponentiell abklingt. ....	37
<b>Abbildung 3.2.1:</b> Flusschema für die Reinigung der Transkriptionsfaktoren und einzelnen Untereinheiten der RNA Polymerase ....	42
<b>Abbildung 3.2.2:</b> BSA-Kalibriergerade ....	44

- Abbildung 3.2.3:** Kristallstruktur der RNA Polymerase aus *Sulfolobus shibatae* (PDB: 2WAQ) mit den drei Modifikationen an den Untereinheiten Rpo11<sup>C88</sup>, Rpo1<sup>E257</sup> und Rpo2<sup>Q373</sup>. Über das Biotin wurde die RNAP auf die Oberfläche immobilisiert. Die Bewegung der RNAP Clamp konnte durch das Auslesen der FRET-Änderung zwischen den beiden Fluorophoren DyLight 550 und DyLight 650 verfolgt werden. ....49
- Abbildung 3.7.1:** Schematische Darstellung der Flusskammer für die Einzelmolekülmikroskopie. Die beiden Deckgläser wurden mittels Parafilm zusammengehalten. In die gebohrten Löcher im dickeren Deckglas wurden nacheinander gekürzte Pipettenspitzen und Gummischläuche geklebt. Die Probe kann mit Hilfe einer Spritze durch die Kammer gezogen werden und Pufferaustausch ist ebenfalls über den Spritzenzugang möglich. ....54
- Abbildung 3.8.1:** Schematischer Aufbau eines Prisma-TIRF Setups. Die beiden Laserstrahlen passieren den polychromatischen akusto-optischen Modulator (AOTF), welcher die Strahlen alterniert. Die Anregungsstrahlen werden weiter auf die Oberfläche geleitet, wo die Farbstoffmoleküle zum fluoreszieren angeregt werden. Das Emissionslicht wird durch das Objektiv eingesammelt und spektral mit einem Dichroiten getrennt. Die Detektion erfolgt mit Hilfe der EMCCD-Kamera. ....55
- Abbildung 3.10.1: (A)** EMCCD-Kamera-Bild der fluoreszierenden Moleküle, die auf der Quarzoberfläche immobilisiert und nach Donor- und Akzeptorkanal getrennt wurden sowie **(B)** die Überlagerung der beiden Kanäle (Darstellung in Falschfarben). Die Bilder wurden hinsichtlich ihrer Detektionskanäle grün und rot eingefärbt **(C)** Exemplarische Intensitäts-Zeitspur eines einzelnen Moleküls, das einen Akzeptor- und Donorfarbstoff trägt. Die rote und violette Spur entsprechen jeweils dem Akzeptor-Molekül mit roter/grüner Anregung und roter Detektion und die grüne Spur entspricht dem Donor-Molekül mit grüner Anregung und grüner Detektion. ....58
- Abbildung 3.10.2:** Typische Einzelmolekülspuren mit und ohne Korrekturfaktoren. Die rote Spur entspricht der Fluoreszenzintensität eines fluoreszenzmarkierten Moleküls bei roter Anregung und roter Detektion, die violette Spur entspricht grüner Anregung und roter Detektion und die grüne Spur entspricht grüner Anregung und grüner Detektion **(A)** Der Akzeptor (rot, violett) bleicht vor dem Donor (grün) und es können **(B)** die Korrekturfaktoren  $\beta$  und  $\gamma$  bestimmt werden. **(C)** Der Donor (grün) bleicht vor dem Akzeptor (rot, violett) und aus dieser Spur kann **(D)** der Korrekturfaktor  $\alpha$  bestimmt werden. ....59
- Abbildung 3.10.3:** Extraktion der FRET-Effizienz und des Gamma-Wertes mit Hilfe der Cursor aus der Intensitäts-Zeitspur. Mehrere hundert korrigierte FRET-Werte wurden anschließend in einem Histogramm dargestellt und mit Hilfe einer oder zwei Gaußfunktionen der Erwartungswert bestimmt. Die mittlere FRET-Effizienz und die Standardabweichung konnten ausgelesen werden. ....60
- Abbildung 4.1.1:** 15% SDS-PAGE von den gereinigten Transkriptionsfaktoren TBP, TFB, TFE und Spt4/5 .....61
- Abbildung 4.2.1: Links:** 10% SDS-PAGE von den gereinigten katalytischen RNAP Untereinheiten Rpo1', Rpo1'', Rpo2' und Rpo2''. **Rechts:** 16%SDS-Gel von den gereinigten RNAP Untereinheiten Rpo5, Rpo6, Rpo4/7, Rpo10, Rpo12, Rpo3/11, Rpo11 und Rpo3. ....62
- Abbildung 4.3.1:** 16% SDS-PAGE von der nicht markierten RNAP Untereinheit Rpo11 und mit dem Fluorophor Alexa647 markierten Rpo11. **Links:** Coomassiefärbung; **Rechts:** Fluoreszenzscan .....63

- Abbildung 4.3.2:** 16% SDS-PAGE von der Assemblierung Rpo3/11<sup>C88</sup>-Biotin. Aufgetragen sind die Rpo3/11-Lösung vor Dialyse (Mix), der Überstand (Ü) und das Pellet (P) nach Hitzeinaktivierung und Zentrifugation.....64
- Abbildung 4.4.1:** 10% SDS-PAGE: Spezifische Markierung über die Staudinger Ligation der RNAP Untereinheiten **(A)** Rpo1<sup>E257Azf</sup> **(B)** und Rpo2<sup>Q373Azf</sup> mit DyLight 650 im Vergleich zu den Wildtyp-Varianten Rpo1' und Rpo2'', welche nicht markiert wurden. *Links:* Coomassiefärbung; *Rechts:* Fluoreszenzscan bei roter Anregung.....65
- Abbildung 4.5.1:** FPLC-Chromatogramm: Der Assemblierungsansatz wurde auf die Gelfiltrationssäule (Superose 6) mit dem Laufpuffer P<sub>100</sub>/β-Mercaptoethanol geladen und darüber die korrekt assemblierte RNAP von den Aggregaten und den überschüssigen Untereinheiten und freien Farbstoff getrennt [30].....66
- Abbildung 4.5.2:** 10% SDS-PAGE der Elutionsfraktionen der Gelfiltrationssäule Superose 6. Aufgetragen ist die konzentrierte doppelt markierte RNAP (Rpo1<sup>E257DyLight550</sup>, Rpo2<sup>Q373DyLight650</sup>), die der injizierten Probe entspricht und die Elutionsfraktionen B2-B14. *Links:* Coomassiefärbung; *Rechts:* Fluoreszenzscan bei grüner (grüne Banden) und roter (rote Banden) Anregung. ....67
- Abbildung 4.5.3:** 10% SDS-PAGE, das alle verwendeten RNA Polymerasen zeigt. *Oben:* Coomassiefärbung; *Unten:* Fluoreszenzscan. Die grünen Banden entsprechen der grünen Anregung und die roten Banden entsprechen der roten Anregung. (1) unmarkierte RNAP (2) RNAP Rpo1<sup>DL550</sup> (3) RNAP Rpo2<sup>DL650</sup> (4) RNAP Rpo1<sup>DL550</sup>\_Rpo2<sup>DL650</sup> (5) RNAP Rpo1<sup>DL650</sup>\_Rpo2<sup>DL550</sup> (6) RNAP Rpo1<sup>DL550</sup>\_Rpo2<sup>DL550</sup>\_Rpo11<sup>Biotin</sup> (7) RNAP ΔRpo6\_Rpo1<sup>DL550</sup>\_Rpo2<sup>DL650</sup>\_Rpo11<sup>Biotin</sup> .....67
- Abbildung 4.6.1:** Kristallstruktur der RNAP aus *Sulfolobus shibatae* (PDB: 2WAQ). Die zugänglichen Volumina der Fluorophore DyLight 550 und DyLight 650 sind jeweils in grün bzw. rot gekennzeichnet.....69
- Abbildung 4.7.1:** 12% native PAGE (EMSA). Es wurden 0,4 μM RNAP, 8,7 μM TBP, 13 μM TFB und 133 nM DNA<sup>Alexa488</sup> für 20 min bei 65°C inkubiert und 0,8 mg/ml Heparin hinzugefügt und für weitere 10 min bei 65°C inkubiert. Die doppelt markierte RNAP bildet ebenfalls, wie die nicht markierte Variante, einen Prä-Initiationskomplex (übernommen und verändert nach [100]). ....70
- Abbildung 4.8.1:** FRET-Effizienz-Histogramme der dreifach markierten RNAP mit unterschiedlicher Untereinheitenzusammensetzung. Gezeigt sind RNAPs bestehend aus **(A)** 10 Untereinheiten, **(B)** allen 12 Untereinheiten, **(C)** 9 Untereinheiten und **(D)** 9 Untereinheiten in Anwesenheit von Rpo4/7, welche ohne die Untereinheit Rpo6 nicht in die RNAP eingebaut werden können. Die Klassenbreite der Histogramme beträgt 0,04 (übernommen und verändert nach [100]). ....71
- Abbildung 4.8.2:** FRET-Effizienz-Histogramme der dreifach markierten RNAP mit TFE. Gezeigt sind RNAPs bestehend aus **(A)** 12 Untereinheiten und **(B)** 10 Untereinheiten jeweils in Anwesenheit von 2 μM TFE. Die Assoziation von TFE an die RNAP ist abhängig von den RNAP Untereinheiten Rpo4/7. **(C)** FRET-Effizienz-Histogramm der dreifach markierten RNAP Wildtyp und **(D)** RNAPΔRpo4/7 in Abwesenheit von TFE. Die Klassenbreite der Histogramme beträgt 0,04.....72

- Abbildung 4.8.3:** FRET-Effizienz-Histogramm der dreifach markierten RNAP in **(A)** An- und **(B)** Abwesenheit von 40  $\mu\text{M}$  Spt4/5. Die Klassenbreite der Histogramme beträgt 0,04..... 73
- Abbildung 4.9.1:** Überlagerung des Donor- und Akzeptorkanals der Kamera. Die Spots sind hinsichtlich ihres Detektionskanals eingefärbt. Im Prä-Initiationskomplex, **(A)** der ohne TFB gebildet wurde, kann die RNAP nicht rekrutiert werden, was in einer geringen Molekülzahl resultierte. Gezeigt ist das Histogramm der FRET-Spuren, die aus sechs Videos stammen. **(B)** Ist TFB Bestandteil des Prä-Initiationskomplexes, der mit einer Heteroduplex DNA gebildet wurde, so konnten doppelt markierte Moleküle (gelb) detektiert werden. Insgesamt sind 53 FRET-Spuren aus sechs aufgenommenen Videos in einem Histogramm dargestellt..... 74
- Abbildung 4.9.2:** DNA-Sequenzen der Homo- und Heteroduplex Promoter-DNA. Der Transkriptionsstartpunkt ist mit jeweils (+1) gekennzeichnet und die DNA-Fehlpaarung in der Heteroduplex DNA ist rot markiert. .... 74
- Abbildung 4.9.3:** FRET-Effizienz-Histogramme der doppelt markierten RNAP Wildtyp im Prä-Initiationskomplex, der mit einer Homoduplex-DNA in **(A)** Abwesenheit und **(C)** Anwesenheit von 2  $\mu\text{M}$  TFE gebildet wurde und der mit einer Heteroduplex-DNA in **(B)** Abwesenheit und **(D)** Anwesenheit von 2  $\mu\text{M}$  TFE gebildet wurde. Die Klassenbreite der Histogramme beträgt 0,04 (übernommen und verändert nach [100]). .... 75
- Abbildung 4.9.4:** FRET-Effizienz-Histogramme der doppelt markierten RNAP  $\Delta\text{Rpo4/7}$  im Prä-Initiationskomplex, der mit der Heteroduplex-DNA in **(A)** Ab- und **(B)** Anwesenheit von 2  $\mu\text{M}$  TFE gebildet wurde. TFE kann bei fehlenden RNAP Untereinheiten Rpo4/7 nicht an die RNAP assoziieren. Die Klassenbreite der Histogramme beträgt 0,04 (übernommen und verändert nach [100]). .... 76
- Abbildung 4.9.5:** FRET-Effizienz-Histogramm der doppelt markierten RNAP Wildtyp im Prä-Initiationskomplex **(A)** vor und **(B)** nach Inkubation des Nukleotids GTP (Endkonzentration: 750  $\mu\text{M}$ ). Die Klassenbreite des Histogramms beträgt 0,04..... 76
- Abbildung 4.10.1:** FRET-Effizienz-Histogramme der doppelt markierten RNAP bestehend aus 12- und 10 Untereinheiten im Elongationskomplex, der mit einer **(A), (B)** 14 nt-langen RNA und mit einer **(C), (D)** 35 nt-langen RNA gebildet wurde. Die Klassenbreite der Histogramme beträgt 0,025. .... 77
- Abbildung 4.10.2:** Überlagerung des Donor- und Akzeptorkanals der Kamera. Die Spots sind hinsichtlich ihrer Detektion eingefärbt. Im Elongationskomplex, der **(A)** ohne RNA gebildet wurde, kann die RNAP nicht rekrutiert werden, was in einer geringen Molekülzahl auf der Oberfläche sowie wenigen FRET-Spuren resultiert. Die FRET-Effizienzen aus fünf aufgenommenen Videos wurden in einem Histogramm dargestellt. **(B)** Ist die RNA im Elongationskomplex vorhanden, so können doppelt markierte Moleküle (gelb) detektiert werden. Gezeigt ist das Histogramm der FRET-Effizienzen aus jeweils fünf aufgenommenen Videos. Als Probe wurde die doppelt markierte RNAP Wildtyp im Elongationskomplex nach Zugabe des richtigen Nukleotids verwendet..... 78
- Abbildung 4.10.3:** FRET-Effizienz-Histogramme der RNAP Wildtyp im Elongationskomplex **(A)** in Abwesenheit des nicht-kodogenen Strangs und **(B)** in Anwesenheit des nicht-kodogenen Strangs, der nachträglich zum Elongationskomplex hinzugefügt wurde. Die Komplexe wurden in beiden

- Fällen über ein Biotin am kodogenen Strang auf der Oberfläche immobilisiert. Die Klassenbreite der Histogramme beträgt 0,025.....79
- Abbildung 4.10.4:** FRET-Effizienz-Histogramm der doppelt markierten RNAP Wildtyp im Elongationskomplex **(A)** in Anwesenheit des Elongationsfaktors Spt4/5 (40 µM) und **(B)** in Abwesenheit von Spt4/5. Die Klassenbreite der Histogramme beträgt 0,025.....80
- Abbildung 4.10.5:** Schematische Darstellung des nicht-hydrolysierbaren Nukleotid-Analogons Adenosin-5'-[( $\alpha$ ,  $\beta$ )-methyleno]Triphosphat. Durch die Alkylgruppe CH<sub>2</sub> (lila) wird das Abspalten des Pyrophosphats bei der RNA Polymerisation verhindert.....81
- Abbildung 4.10.6:** Die drei unterschiedlichen RNA Sequenzen und die Teilsequenz des kodogenen/nicht-kodogenen Strangs sind dargestellt. RNA T40 und T43 bestehen jeweils aus 14 Nukleotiden, dessen Sequenz aber um ein Nukleotid verschoben ist. Die lange RNA besteht aus 35 Nukleotiden. Die dunkelgrüne Sequenz der RNA ist komplementär zum kodogenen Strang, während die hellgrüne Sequenz nicht mit dem kodogenen Strang hybridisieren kann. Das jeweils darauffolgende richtige (dunkelgrün) und falsche (pink) Nukleotid sind jeweils für die unterschiedlichen RNA Sequenzen eingezeichnet. ....81
- Abbildung 4.10.7:** FRET-Effizienz-Histogramme der doppelt markierten RNAP Wildtyp im Elongationskomplex und in Anwesenheit des **(A)**, **(B)**, **(D)** richtigen Nukleotids (UTP, ATP), des **(C)** falschen Nukleotids (ATP) und **(E)** eines nicht-hydrolysierbaren Nukleotid-Analogons Adenosin-5'-[( $\alpha$ ,  $\beta$ )-methyleno]Triphosphat (übernommen und verändert nach [100]). ....82
- Abbildung 4.11.1:** FRET-Effizienz-Histogramme von Elongationskomplexen, welche **(A)**, **(B)** die dreifach markierte RNAP und **(C)**, **(D)**, **(E)**, **(F)** die doppelt markierte RNAP enthalten. Die Komplexe wurden entweder über das Biotin in der RNAP Untereinheit Rpo11, dem Biotin im nicht-kodogenen Strang oder im kodogenen Strang immobilisiert. In allen Fällen wurden zwei Populationen gemessen, deren mittlere FRET-Effizienzen unabhängig von der Wahl der Immobilisierung sind (übernommen und verändert aus [100])....84
- Abbildung 4.11.2:** FRET-Effizienz-Histogramme der doppelt markierten **(A)** RNAP $\Delta$ Rpo4/7\_Rpo1<sup>E257\*DL650</sup>\_Rpo2<sup>Q373\*DL550</sup> (Farbstoffpositionen getauscht) und **(B)** der doppelt markierten RNAP $\Delta$ Rpo4/7\_Rpo1<sup>E257\*DL550</sup>\_Rpo2<sup>Q373\*DL650</sup> (Standardpositionen der Farbstoffe) im Elongationskomplex. Die Wahl der Farbstoffpositionierung hat keinen Einfluss auf die mittleren FRET-Effizienzen und die Verteilung der Populationen (übernommen und verändert nach [100]).....85
- Abbildung 4.11.3:** FRET-Effizienz-Histogramme der RNAP Wildtyp im Elongationskomplex, das **(A)** die RNA T40 und **(B)** die RNA T43 enthält. Die Klassenbreite der Histogramme beträgt 0,025. ....86
- Abbildung 4.12.1:** Zusammenfassung aller Histogramme, die zur jeweiligen Phase des Transkriptionszyklus gehören. Dabei wurden nur Daten gewählt, die in Abwesenheit aller Transkriptionsfaktoren und Nukleotide gemessen wurden. Die RNAP Clamp nimmt in einer freien Konfiguration, im Prä-Initiations- und Elongationskomplex jeweils zwei Konformationen ein, die sich in jeweils zwei Populationen widerspiegeln. (übernommen und verändert nach [100]). ....87
- Abbildung 5.3.1:** Strukturmodell des archaeeellen offenen Prä-Initiationskomplexes, das durch mehrere Einzelmolekül-FRET-Messungen in Kombination mit dem *nanopositioning system* bestimmt wurde [49]. Der



Prä-Initiationskomplex besteht aus der Promoter-DNA (nicht-kodogener Strang: cyan; kodogener Strang: blau), TBP (orange), TFB (grün), TFE (violett) und der RNAP (grau). Die RNAP Untereinheiten Rpo4/7 sind in hellblau gekennzeichnet. Die TFE *winged-helix*-Domäne, der nicht-kodogene Strang der Promoter-DNA (Position -13 bis -9) und das RNAP Clamp *coiled-coil motif* (rot) befinden sich in unmittelbarer Nähe. .... 94

**Abbildung 5.5.1:** Zusammenfassende Darstellung der möglichen Konformationen der archaeellen RNAP Clamp innerhalb des Transkriptionszyklus. In der freien RNAP wurden zwei Populationen mit den FRET-Effizienzen von  $E=0,38$  und  $E=0,66$  gefunden, wobei die erstere einer offenen und letztere einer kollabierten Konformation der RNAP Clamp entspricht. Der Transkriptionsfaktor TFE und der Elongationsfaktor Spt4/5 beeinflussen beide die Konformation der Clamp, was in einer kollabierten Konformation resultiert. Im Prä-Initiationskomplex können die Populationen mit den FRET-Effizienzen von  $E=0,42$  und  $E=0,62$  der offenen und geschlossenen RNAP Clamp Konformation zugeordnet werden. Eine künstliche vorgefertigte Transkriptionsblase in der Promoter-DNA, dass das Laden des kodogenen Strangs ins aktive Zentrum der RNAP erleichtert sowie die Zugabe von TFE führen zum Öffnen der RNAP Clamp. In der Elongationsphase existieren ebenfalls zwei Populationen mit den FRET-Effizienzen  $E=0,50$  und  $E=0,62$ , die die RNAP in einem prozessivem und nicht-prozessivem Zustand widerspiegeln. Die RNAP Clamp Konformation wird dabei vom nicht-kodogenen Strang, von Nukleotiden und von Spt4/5 beeinflusst (übernommen und verändert nach [100]). .... 99

**Abbildung B.1.1:** FPLC-Chromatogramm des TBP-Gelfiltrationslaufs (HiPrep-Sephacryl, S-100 16/60). Die Absorptionen bei den Wellenlängen 280 nm (blau) und 260 nm (rot) und die Leitfähigkeit (braun) sind auf der y-Achse dargestellt. Auf der x-Achse sind das Durchflussvolumen des Puffers ( $P_{300}/\beta$ -Mercaptoethanol) und die gesammelten Fraktionen (jeweils 5ml) aufgetragen. .... 105

**Abbildung B.1.2:** 15%SDS-Gel, das die Elutionsfraktionen des Gelfiltrationslaufs mit TBP zeigt. Die Fraktionen A1-A12 sind auf dem SDS-Gel aufgetragen. Die Fraktionen A2-A4 wurden mit Hilfe eines Konzentrators (Amicon Ultra-15, MWCO:3000 Da, Merck Millipore) konzentriert. .... 105

**Abbildung B.2.1:** FPLC-Chromatogramm des Affinitätschromatographielaufs für TFB<sup>His</sup> (HisTrap FF 1ml). Die Absorptionen bei den Wellenlängen 280 nm (blau) und 260 nm (rot) und die Leitfähigkeit (braun) sind auf der y-Achse dargestellt. Auf der x-Achse sind das Durchflussvolumen des Puffers (Puffer A:  $N_{500}$ ; 0,5% Triton; 20 mM Imidazol; Puffer B:  $N_{500}$ ; 0,5% Triton, 250 mM Imidazol) und die gesammelten Fraktionen (jeweils 1ml) aufgetragen. .... 106

**Abbildung B.2.2:** 15%SDS-Gel, das die Elutionsfraktionen des Affinitätschromatographielaufs mit TFB<sup>His</sup> zeigt. Der Überstand (Ü) und die Fraktionen A1-A8 sind auf dem SDS-Gel aufgetragen. Die Fraktionen A4-A8 enthalten das Protein TFB. .... 106

**Abbildung B.3.1:** FPLC-Chromatogramm des Affinitätschromatographielaufs für TFE (HisTrap FF 1ml). Die Absorptionen bei den Wellenlängen 280 nm (blau) und 260 nm (rot), sowie die Leitfähigkeit (braun) sind auf der y-Achse dargestellt. Auf der x-Achse sind das Durchflussvolumen des Puffers (Puffer A: 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 250 mM NaCl, 6 M Harnstoff; Puffer B: 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 250 mM NaCl, 30% Glycerin, 20 mM Imidazol). Die

Elution erfolgte manuell mit dem Puffer C: 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 250 mM NaCl, 30% Glyzerin, 250 mM Imidazol. ....	107
<b>Abbildung B.3.2:</b> 15%SDS-Gel, das die Elutionsfraktionen des Affinitätschromatographielaufs mit TFE zeigt. Die manuell gesammelten Fraktionen 1-8 sind auf dem SDS-Gel aufgetragen. Die Fraktionen 3-8 enthalten das Protein TFE.....	107
<b>Abbildung B.4.1:</b> FPLC-Chromatogramm des Affinitätschromatographielaufs für Spt4/5 <sup>GST</sup> (GSTrap 1ml). Die Absorptionen bei den Wellenlängen 280 nm (blau) und 260 nm (rot) sind auf der y-Achse dargestellt. Auf der x-Achse sind das Durchflussvolumen des Puffers (Puffer A: P <sub>100</sub> /β-Mercaptoethanol; Puffer B: P <sub>100</sub> /5 mM DTT, 10 mM Glutathion) und die gesammelten Fraktionen (jeweils 1ml) aufgetragen. ....	108
<b>Abbildung B.4.2:</b> 15%SDS-Gel, das die Elutionsfraktionen des Affinitätschromatographielaufs mit Spt4/5 <sup>GST</sup> zeigt. Der Überstand (Ü), der Durchfluss (D) und die Fraktionen B1-B9 sind auf dem SDS-Gel aufgetragen. Die Fraktionen B3-B6 enthalten das Protein Spt4/5.....	108
<b>Abbildung B.5.1:</b> FPLC-Chromatogramm Rpo5-Gelfiltrationslaufs (HiPrep-Sephacryl, S-100 16/60). Die Absorptionen bei den Wellenlängen 280 nm (blau) und 260 nm (rot) und die Leitfähigkeit (braun) sind auf der y-Achse dargestellt. Auf der x-Achse sind das Durchflussvolumen des Puffers (P <sub>300</sub> /β-Mercaptoethanol) und die gesammelten Fraktionen (jeweils 5ml) aufgetragen.....	109
<b>Abbildung B.5.2:</b> 16%SDS-Gel, das die Elutionsfraktionen des Gelfiltrationslaufs mit Rpo5 zeigt. Der Überstand (Ü) und die Fraktionen A1-B1 sind auf dem SDS-Gel aufgetragen. Die Fraktionen A9-B1 wurden mit Hilfe eines Konzentrators (Amicon Ultra-15, MWCO:3000 Da, Merck Millipore) konzentriert. ....	109
<b>Abbildung B.6.1:</b> FPLC-Chromatogramm des Affinitätschromatographielaufs für Rpo6 <sup>His</sup> (HisTrap FF 1ml). Die Absorptionen bei den Wellenlängen 280 nm (blau) und 260 nm (rot) sind auf der y-Achse dargestellt. Auf der x-Achse sind das Durchflussvolumen des Puffers (Puffer A: P <sub>300</sub> , 6 M Harnstoff, 20 mM Imidazol; Puffer B: P <sub>300</sub> , 6 M Harnstoff, 250 mM Imidazol) und die gesammelten Fraktionen (jeweils 1 ml) aufgetragen.....	110
<b>Abbildung B.6.2:</b> 16%SDS-Gel, das die Elutionsfraktionen des Affinitätschromatographielaufs mit Rpo6 <sup>His</sup> zeigt. Der Überstand (Ü) und die Fraktionen A2, A12-B7 sind auf dem SDS-Gel aufgetragen. Die Fraktionen A14-B7 enthalten das gewünschte Protein Rpo6 <sup>His</sup> .....	110
<b>Abbildung B.7.1:</b> FPLC-Chromatogramm Rpo4/7-Gelfiltrationslaufs (HiPrep-Sephacryl, S-100 16/60). Die Absorptionen bei den Wellenlängen 280 nm (blau) und 260 nm (rot) und die Leitfähigkeit (braun) sind auf der y-Achse dargestellt. Auf der x-Achse sind das Durchflussvolumen des Puffers (P <sub>300</sub> /β-Mercaptoethanol) und die gesammelten Fraktionen (jeweils 5ml) aufgetragen.....	111
<b>Abbildung B.7.2:</b> 15%SDS-Gel das die Elutionsfraktionen des Gelfiltrationslaufs mit Rpo4/7 zeigt. Die Fraktionen A7-A11 sind auf dem SDS-Gel aufgetragen. Die Fraktionen A10 und A11 wurden mit Hilfe eines Konzentrators (Amicon Ultra-15, MWCO:3000 Da, Merck Millipore) konzentriert. ....	111

- Abbildung B.8.1:** FPLC-Chromatogramm des Rpo10-Gelfiltrationslaufs (HiPrep-Sephacryl, S-100 16/60). Die Absorptionen bei den Wellenlängen 280 nm (blau) und 260 nm (rot) und die Leitfähigkeit (braun) sind auf der y-Achse dargestellt. Auf der x-Achse sind das Durchflussvolumen des Puffers ( $P_{300}/\beta$ -Mercaptoethanol) und die gesammelten Fraktionen (jeweils 5ml) aufgetragen..... 112
- Abbildung B.8.2:** 16%SDS-Gel, das die Elutionsfraktionen des Gelfiltrationslaufs mit Rpo10 zeigt. Die Fraktionen A1-B2 sind auf dem SDS-Gel aufgetragen. Die Fraktionen A9-B1 wurden mit Hilfe eines Konzentrators (Amicon Ultra-15, MWCO:3000 Da, Merck Millipore) konzentriert. .... 112
- Abbildung B.9.1:** FPLC-Chromatogramm des Rpo12-Gelfiltrationslaufs (HiPrep-Sephacryl, S-100 16/60). Die Absorptionen bei den Wellenlängen 280 nm (blau) und 260 nm (rot) und die Leitfähigkeit (braun) sind auf der y-Achse dargestellt. Auf der x-Achse sind das Durchflussvolumen des Puffers ( $P_{300}/\beta$ -Mercaptoethanol) und die gesammelten Fraktionen (jeweils 5 ml) aufgetragen..... 113
- Abbildung B.9.2:** 16%SDS-Gel, das die Elutionsfraktionen des Gelfiltrationslaufs mit Rpo12 zeigt. Die Fraktionen A3-B1 sind auf dem SDS-Gel aufgetragen. Die Fraktionen A11-B1 wurden mit Hilfe eines Konzentrators (Amicon Ultra-15, MWCO:3000 Da, Merck Millipore) konzentriert. .... 113
- Abbildung B.10.1:** FPLC-Chromatogramm des Rpo3/11-Gelfiltrationslaufs (HiPrep-Sephacryl, S-100 16/60). Die Absorptionen bei den Wellenlängen 280 nm (blau) und 260 nm (rot) und die Leitfähigkeit (braun) sind auf der y-Achse dargestellt. Auf der x-Achse sind das Durchflussvolumen des Puffers ( $P_{300}/\beta$ -Mercaptoethanol) und die gesammelten Fraktionen (jeweils 5 ml) aufgetragen..... 114
- Abbildung B.10.2:** 15% SDS-Gel, das die Elutionsfraktionen des Gelfiltrationslaufs mit Rpo3/11 zeigt. Die Fraktionen A7-B6 sind auf dem SDS-Gel aufgetragen und die Fraktionen A8-A11 wurden mit Hilfe des Konzentrators (Amicon Ultra-15, MWCO:3000 Da, Merck Millipore) konzentriert. .... 114
- Abbildung B.11.1:** FPLC-Chromatogramm des Rpo3-Gelfiltrationslaufs (HiPrep-Sephacryl, S-100 16/60). Die Absorptionen bei den Wellenlängen 280 nm (blau) und 260 nm (rot) und die Leitfähigkeit (braun) sind auf der y-Achse dargestellt. Auf der x-Achse sind das Durchflussvolumen des Puffers ( $P_{300}/\beta$ -Mercaptoethanol) und die gesammelten Fraktionen (jeweils 5 ml) aufgetragen..... 115
- Abbildung B.11.2:** 15%SDS-Gel das die Elutionsfraktionen des Gelfiltrationslaufs mit Rpo3 zeigt. Der Überstand und die Fraktionen A1-A10 sind auf dem SDS-Gel aufgetragen..... 115
- Abbildung B.12.1:** FPLC-Chromatogramm des Rpo11-Gelfiltrationslaufs (HiPrep-Sephacryl, S-100 16/60). Die Absorptionen bei den Wellenlängen 280 nm (blau) und 260 nm (rot) und die Leitfähigkeit (braun) sind auf der y-Achse dargestellt. Auf der x-Achse sind das Durchflussvolumen des Puffers ( $P_{300}/\beta$ -Mercaptoethanol) und die gesammelten Fraktionen (jeweils 5 ml) aufgetragen..... 116
- Abbildung B.12.2:** 16%SDS-Gel, das die Elutionsfraktionen des Gelfiltrationslaufs mit Rpo11 zeigt. Der Überstand (Ü) und die Fraktionen A1-A10 sind auf dem SDS-Gel aufgetragen. Die Fraktionen A5-A7 wurden mit dem Puffer

- 50 mM Tris/HCl, pH 7.5; 50 mM NaCl verdünnt und einer weiteren Reinigung (Anionenaustauschchromatographie) unterzogen. .... 116
- Abbildung B.12.3:** FPLC-Chromatogramm des Rpo11-Anionenaustauscherchromatographielaufs (MonoQ 4,6/100 PE). Die Absorptionen bei den Wellenlängen 280 nm (blau) und 260 nm (rot) und die Leitfähigkeit (braun) sind auf der y-Achse dargestellt. Auf der x-Achse sind das Durchflussvolumen des Puffers (Puffer A: 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 50 mM NaCl; Puffer B: 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 1 M NaCl) und die gesammelten Fraktionen (jeweils 1 ml) aufgetragen. .... 117
- Abbildung B.12.4:** 16%SDS-Gel, das die Elutionsfraktionen des Anionenaustauscherlaufs mit Rpo11 zeigt. Der Überstand (Ü) und die Fraktionen A8-B3 sind auf dem SDS-Gel aufgetragen. Die Fraktionen A8-A11 wurden gesammelt. .... 117
- Abbildung B.13.1:** FPLC-Chromatogramm des Affinitätschromatographielaufs für Rpo1<sup>E257Azf</sup> (HisTrap FF 1ml). Die Absorptionen bei den Wellenlängen 280 nm (blau) und 260 nm (rot), sowie die Leitfähigkeit (braun) sind auf der y-Achse dargestellt. Auf der x-Achse sind das Durchflussvolumen des Puffers (Puffer A: 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 250 mM NaCl, 6 M Harnstoff, 20 mM Imidazol; Puffer B: 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 250 mM NaCl, 6 M Harnstoff, 250 mM Imidazol) und die gesammelten Fraktionen (jeweils 1 ml) aufgetragen. .... 118
- Abbildung B.13.2:** 10%SDS-Gel, das die Elutionsfraktionen des Affinitätschromatographielaufs mit Rpo1<sup>E257Azf</sup> zeigt. Der Überstand (Ü) und die Fraktionen A2, A3, B11-C2 sind auf dem SDS-Gel aufgetragen. Die Fraktionen B11-B15 enthalten das gewünschte Protein. .... 118
- Abbildung B.14.1:** FPLC-Chromatogramm des Affinitätschromatographielaufs für Rpo2<sup>Q373Azf</sup> (HisTrap FF 1ml). Die Absorptionen bei den Wellenlängen 280 nm (blau) und 260 nm (rot) und die Leitfähigkeit des Puffers (braun) sind auf der y-Achse dargestellt. Auf der x-Achse sind das Durchflussvolumen des Puffers (Puffer A: 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 250 mM NaCl, 6 M Harnstoff, 20 mM Imidazol; Puffer B: 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 250 mM NaCl, 6 M Harnstoff, 250 mM Imidazol) und die gesammelten Fraktionen (jeweils 1 ml) aufgetragen. .... 119
- Abbildung B.14.2:** 10%SDS-Gel, das die Elutionsfraktionen des Affinitätschromatographielaufs mit Rpo2<sup>Q373Azf</sup> zeigt. Der Überstand (Ü) und die Fraktionen A1-A4 sind auf dem SDS-Gel aufgetragen. Die Fraktionen A2 und A3 enthalten das gewünschte Protein. .... 119
- Abbildung C.1:** FRET-Effizienz-Histogramme der doppelt markierten RNAPΔRpo4/7 im Elongationskomplex **(A)** in Anwesenheit des richtigen Nukleotids UTP bzw. ATP **(B)** und **(D)**, des falschen Nukleotids ATP **(C)** und eines nicht-hydrolysierbaren Nukleotid-Analogons AMPcPP **(E)**. .... 121

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 3.1.1:</b> Zusammensetzung des Vollmediums .....	38
<b>Tabelle 3.1.2:</b> Zusammensetzung des Minimal Mediums.....	39
<b>Tabelle 3.1.3:</b> Zusammensetzung der Mikronährstoffe mit einer 1000 x Konzentration.....	40
<b>Tabelle 3.1.4:</b> Zusammensetzung der Vitamine mit einer 1000 x Konzentration.....	40
<b>Tabelle 3.2.1:</b> Zusammensetzung des Puffers N <sub>500</sub> .....	43
<b>Tabelle 3.2.2:</b> Zusammensetzung der SDS-Gele.....	46
<b>Tabelle 3.2.3:</b> Zusammensetzung des Lauf- und Auftragspuffers .....	46
<b>Tabelle 3.2.4:</b> Zusammensetzung des nativen Lauf- und Auftragspuffers.....	47
<b>Tabelle 3.2.5:</b> Dialysevorschrift.....	48
<b>Tabelle 3.3.1:</b> Verwendete Oligonukleotide. Die rot markierten Basen geben die DNA-Fehlpaarung um den Transkriptionsstartpunkt an.....	50
<b>Tabelle 4.1.1:</b> Molekulargewicht und Extinktionskoeffizient der einzelnen Transkriptionsfaktoren .....	61
<b>Tabelle 4.2.1:</b> Molekulargewicht und Extinktionskoeffizient der einzelnen RNAP Untereinheiten .....	62
<b>Tabelle 4.6.1</b> Anisotropiewerte für einzeln markierte RNAP in Ab-und Anwesenheit der Transkriptionsfaktoren TFE und Spt4/5 und doppelt markierter RNAP.....	68
<b>Tabelle 4.6.2:</b> Zusammenfassung der Linkerlänge und –breite, der geometrischen Ausdehnung der Fluorophore DyLight 550 und DyLight 650 und der Atom ID. Die Atom ID gibt die Position in der verwendeten Kristallstruktur der RNAP aus <i>Sulfolobus shibatae</i> (PDB: 2WAQ) an, an welche die Fluorophore gekoppelt sind.....	68